DOI:10.12441/spyswjs.20231017004 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0031-10

杭州市猪肉生产链中粪肠球菌耐药性及传播特性分析

钱 敏[1] 周 炜[2] 周芷锦[2] 张恩宝[1] 韩剑众[1] 曲道峰[1*]

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院,浙江 杭州 310018;2. 浙江省动物疫病预防控制中心,浙江 杭州 311199)

摘要:【目的】评估猪肉生产链中粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*,*E. faecalis*)耐药情况及传播风险。【方法】从浙江省杭州市2家养猪场、1家屠宰场和2家市场中采集生猪体表、胴体及环境样品共300份。分别通过16S rDNA测序、肉汤微量稀释法(MIC)和PCR法进行菌株鉴定、耐药表型测定以及耐药基因型和毒力基因型鉴定,开展多位点序列分型(multilocus sequencing typing,MLST)分析和接合转移试验。【结果】分离得到的125株粪肠球菌对泰妙菌素、四环素和多西环素等抗生素有较高的耐药率,且养猪场分离株对抗生素的耐药率均高于屠宰场和市场。基因型鉴定结果表明,125株粪肠球菌中,10种耐药基因均有检出,其中*optrA*、*tet(M)*、*tet(L)*、*erm(B)*的检出率较高,耐药基因检出率排序为:养猪场>屠宰场>市场。已检测的毒力基因中,*efaA*的携带率最高,其他依次为*gelE*、*asa1*、*ace*、*cylA*、*hyl*、*esp*,毒力基因携带率排序为:养猪场>屠宰场>市场。MLST分析表明,水平传播是*optrA*在浙江省杭州市猪源粪肠球菌中流行的主要机制。接合转移结果显示,12株猪源菌株中,*optrA*可通过质粒接合作用转移到受体菌JH2-2中。【结论】作者对猪肉生产链中的粪肠球菌进行了耐药性评估与传播风险研究,为保障肉类食品安全提供了理论依据。

关键词:粪肠球菌;猪肉生产链;耐药性;耐药基因;毒力基因

Antibiotic Resistance and Transmission Characteristics of *Enterococcus faecalis* from the Pork Production Chain in Hangzhou

QIAN Min[1] *ZHOU Wei*[2] *ZHOU Zhijin*[2] *ZHANG Enbao*[1] *HAN Jianzhong*[1] *QU Daofeng*[1*]

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Provincial Center for Animal Disease Prevention and Control, Hangzhou 311199, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to evaluate the antibiotic resistance and transmission risk of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) in the pork production chain. [**Method**] A total of 300 samples were collected from the surface of live pigs, carcasses, and the environment in 2 pig farms, 1 slaughterhouse, and 2 markets in Hangzhou, Zhejiang. The strain identification, antibiotic resistance phenotypes, resistance genotypes, and virulence genotypes were performed by 16S rDNA sequences, broth microdilution method (MIC), and PCR. In addition, multilocus sequencing typing (MLST) and conjugational transfer tests were conducted. [**Result**] The 125 isolates of *E. faecalis* showed high resistance to antibiotics such as tiamulin, tetracycline, and doxycycline, and the isolates from pig farms showed higher antibiotic resistance rates than those from the slaughterhouse and markets. Ten antibiotic resistance genes were detected in the 125 strains of *E. faecalis*, and the detection rates of *optrA*, t*et(M)*, *tet(L)*, and *erm(B)* were higher. The detection rate of antibiotic resistance genes followed the trend of pig

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172188);浙江省“三农九方”科技协作计划“揭榜挂帅”项目(2023SNJF058-2)。

通信作者:曲道峰(1983—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品加工质量与安全研究。E-mail:daofeng@mail.zjgsu.edu.cn

收稿日期:2023-10-17 **修回日期:**2023-12-22

farm > slaughterhouse > market. Among the virulence genes tested, *efaA* was the most prevalent, followed by *gelE*, *asa1*, *ace*, *cylA*, *hyl*, and *esp*. Overall, the detection rate of virulence genes was the highest in pig farms, moderate in the slaughterhouse, and the lowest in markets. MLST results indicated that horizontal transmission was the main mechanism for the prevalence of *optrA* in pig-derived *E. faecalis* in Hangzhou, Zhejiang. The results of conjugation transfer tests showed that *optrA* in 12 pig-derived strains could be transferred to the recipient strain JH2-2 by plasmid conjugation. [**Conclusion**] The antibiotic resistance and transmission risk of *E. faecalis* in the pork production chain are assessed, which provides a theoretical basis for ensuring the safety of meat products.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; pork production chain; antibiotic resistance; antibiotic resistance genes; virulence genes

20世纪80年代，抗生素开始用于畜禽养殖，其主要作为抗菌药物治疗畜禽的细菌性疾病，还作为饲料添加剂促进畜禽生长，这种用药方式在畜禽生长环境中提供了持续性的选择压力，使细菌产生抗生素耐药性并迅速传播[1]。此外，畜禽环境中携带抗性基因的宿主病原菌可以通过食物链直接传播给人类，也可以通过环境间接传播给人类，动物病原体和人体中不断提高的抗生素耐药性已被世界卫生组织确定为公共卫生的新挑战[2-3]。长期以来，我国生猪养殖中不合理使用兽用抗生素，导致动物源性细菌耐药率上升，出现了“超级细菌”，如耐万古霉素肠球菌[4]。研究表明，细菌致病性是由毒力因子与耐药性协同作用的结果[5]。肠球菌具有将耐药性及毒力因子以水平转移的方式传播给其他细菌的能力。近年来，肠球菌（尤其是粪肠球菌）作为条件致病菌在我国临床治疗中引发的感染事件持续增多，对公众健康安全产生了较大威胁[6-7]。在生猪养殖过程中，使用抗菌药物可导致某些致病菌死亡，但肠球菌可能会一直存在于生猪体内，并通过屠宰等加工环节污染食品。通过分析猪肉生产链中肠球菌的耐药性，可反映猪肉在生产过程中生产用药、病原菌耐药情况及猪肉中抗菌药物的残留水平[8-11]。目前国内外关于生猪养殖中病原性粪肠球菌的分离鉴定、污染调查、快速检测方面的研究较多，而关于猪肉生产链（养殖场—屠宰场—市场）中粪肠球菌的污染状况及其耐药性研究较少。

作者对浙江省杭州市的养猪场、屠宰场及相应的猪肉销售农贸市场进行生猪体表、胴体和环境样品的采集，通过16S rDNA测序进行菌株鉴定，对分离得到的粪肠球菌进行耐药表型与基因型的检测，并对毒力基因进行筛查，通过MLST分析以及接合转移试验从亲缘关系及水平转移的角度研究猪肉生产链中粪肠球菌的传播特点。该研究可为生猪养殖业的合理用药提供参考依据，也可为缓解粪肠球菌耐药性的发展和研究耐药新策略提供理论支持，以期从源头保障猪肉品质与安全，维护消费者的健康。

1 材料和方法

1.1 样品采集与处理

从浙江省杭州市的2家大型养猪场（90份）、1家屠宰场（100份）和2家市场（110份）进行采样，生猪体表、胴体及环境样本共计300份。样品置于无菌样品袋与采样管中，样品采集后均立刻置于低温（2~8 ℃）样品箱中，并在抵达实验室后进行分离粪肠球菌的前处理工作。

1.2 菌株与主要试剂

标准质控粪肠球菌（ATCC29212）和接合转移工程菌（JH2-2）均购自青岛海博生物技术有限公司。

脑心浸液（BHI）培养基、细菌琼脂粉、肠球菌显示培养基、Cary-Blair氏运送培养基：青岛海博生物技术有限公司；琼脂糖：英国OXOID公司；革兰氏阳性菌鉴定卡：法国BioMérieux公司；磁珠菌种保存管：加拿大Pro-Lab公司；组合式药敏MIC测试盒：天津市金章科技发展有限公司；耐药基因引物、毒力基因引物、DL2000 DNA Marker、50×TAE缓冲液：生工生物工程（上海）股份有限公司；阳离子调节M-H肉汤（CAMHB）：上海雅吉生物科技有限公司；2× *Taq* PCR Master Mix、10

mg/mL溴化乙锭（EB）：BBI生命科学有限公司。

1.3　菌株的初筛与鉴定

将采集到的样品接种至10 mL灭菌生理盐水中，充分振荡混匀，将菌液稀释至1×10^{-6} CFU/mL。将合适浓度的菌液接种至肠球菌显色琼脂平板上，于（36±1）℃培养18~24 h。挑取红色至紫红色的可疑菌落于1 mL BHI肉汤，42 ℃培养16~20 h后进行PCR鉴定。按细菌基因组DNA快速抽提试剂盒的要求，提取疑似菌株的总DNA作为PCR模板，提取标准质控粪肠球菌（ATCC29212）的总DNA作为PCR阳性对照。取扩增产物加到1.5 g/dL琼脂糖凝胶中进行电泳，观察琼脂糖凝胶在1 500 bp处是否有对应条带，将PCR产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，测序结果经NCBI数据库BALST比对后对菌株进行鉴定[12]，将鉴定为粪肠球菌的菌株保存至磁珠菌种保存管中。

1.4　最小抑菌质量浓度的测定

根据美国临床和实验室标准协会（CLSI）标准中的肠球菌MIC检测抗生素的种类，结合畜禽用药和研究需要，共选择14种抗生素（青霉素、阿莫西林/克拉维酸、庆大霉素、红霉素、替米考星、氟苯尼考、磺胺异恶唑、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、万古霉素、多西环素、四环素、恩诺沙星、利奈唑胺、泰妙菌素），利用组合式药敏MIC测试盒测定药物对本研究中分离到的粪肠球菌的最小抑菌质量浓度。

1.5　耐药基因及毒力基因的PCR检测

根据已报道的引物序列，采用PCR法对恶唑烷酮类、酰胺醇类、林可胺类、截短侧耳类、链阳霉素A类、大环内酯类和四环素类耐药基因进行检测，配制耐药基因扩增体系，扩增条件为：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，对应引物的退火温度退火40 s，72 ℃延伸40 s，进行30个循环；72 ℃终延伸5 min。

根据已报道的毒力基因引物，对*ace*、*cylA*、*efaA*、*esp*、*gelE*、*asal*、*hyl*这7种常见的毒力基因进行筛查。按各自PCR扩增条件扩增后，将成功扩增出清晰条带的样品送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序分析，测序结果经BLAST[12]比对后进行下一步分析。

1.6　MLST分析

对分离自猪肉生产链的30株恶唑烷酮类耐药基因*optrA*阳性的粪肠球菌进行MLST分析。从pubmlst网站（http://www.mlst.net）中查询粪肠球菌的7对管家基因，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行引物合成，采用煮沸法对细菌DNA模板进行粗提。粪肠球菌PCR程序：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，循环30次；72 ℃恒温延伸7 min。扩增阳性的PCR扩增产物，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，测序结果提交至粪肠球菌MLST数据库（https://pubmlst.org/organisms/），用于分析管家基因编号和确定其ST型。引物名称及序列见表1。

表1　粪肠球菌MLST分型引物序列

Table 1　Primer sequences for MLST of *E. faecalis*

引物名称	引物序列（5′—3′）	片段长度/bp
gdh	F：GGCGCACTAAAAGATATGGT R：CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
gyd	F：CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC R：CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
pstS	F：CGGAACAGGACTTTCGC R：ATTTACATCACGTTCTACTTGC	583
gki	F：GATTTTGTGGGAATTGGTATGG R：ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	438
aroE	F：TGGAAAACTTTACGGAGACAGC R：GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	459
xpt	F：AAAATGATGGCCGTGTATTAGG R：AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	456
yiql	F：CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG R：GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	436

1.7　粪肠球菌耐药性转移

选取耐药粪肠球菌作为供体菌，肠球菌JH2-2作为受体菌，采用滤膜杂交法[13]分析粪肠球菌耐药性的转移情况。将过夜活化后的粪肠球菌和受体菌接种到新鲜培养基中，培养至菌液OD_{600}值为1.0，将1 mL供体菌和4 mL受体菌混合，取面积为1 cm^2、孔径为0.45 μm的滤膜平铺于MH平板上，待滤膜充分吸收菌液，将平板倒置，于37 ℃培养过夜后，用1 mL MH液体培养基冲洗滤膜，将洗涤的菌悬液涂布于含有64 μg/mL氟苯尼考、128 μg/mL利福平和128 μg/mL夫西地酸的平板上，培养72 h后观察结果。另外，将供体菌和受体菌分别涂布

于含有利福平和氟苯尼考的MH双抗平板上，作为阴性对照。当阴性对照的供体菌双抗平板上无细菌生长时，计算接合效率。为了确认接合前后耐药质粒和耐药基因的转移，采用MIC测定供体菌、受体菌和接合子的药物敏感性。

1.8 数据分析

运用SPSS 16.0对试验数据进行统计分析[14]，并通过Origin 8.0进行可视化。通过Heatmapper聚类分析抗生素多重耐药性热图。

2 结果与讨论

2.1 粪肠球菌的分离鉴定

在浙江省杭州市采集的300份样品中，共分离得到125株粪肠球菌，总分离率为41.7%。表2展示了浙江省杭州市2家大型养猪场、1家屠宰场和2家市场的粪肠球菌分离情况，其中养猪场样本中粪肠球菌分离率最高，为52.2%；屠宰场次之，分离率为44.0%；市场最低，分离率为30.9%，分离率沿生产链逐渐降低。这可能是由于养猪场中生猪使用了大量的抗生素，这些产生耐药性的菌株存在生猪体表并被带入屠宰环节，且屠宰场环境中可能存在耐药菌交叉污染情况，导致胴体中的污染率较高。市场的分离率有一定程度的降低但仍然较高，说明进入市场前，尽管有加强卫生管理，但相互之间依然会发生交叉感染[15-16]。

表2 粪肠球菌的分离

Table 2 Isolation of *E. faecalis*

采样地点	样品数量	分离数	分离率/%
养猪场	90	47	52.2
屠宰场	100	44	44.0
市场	110	34	30.9

2.2 各生产链中粪肠球菌的耐药率分析

由图1可知，3个环节分离到的粪肠球菌对14种抗生素呈现出不同的耐药表型。其中对泰妙菌素的耐药率最高，均在90.00%以上，养猪场耐药率最高（97.87%），其次分别为屠宰场（95.45%）和市场（91.12%）。此外，3个环节的粪肠球菌对四环素和多西环素也呈现出高度耐药性，耐药率均在75.00%以上。养猪场的粪肠球菌对这2种抗生素的耐药性比其他环节高，对四环素的耐药率为95.74%，高于屠宰场（93.18%）和市场（82.85%）；对多西环素的耐药率为91.49%，高于屠宰场（86.36%）和市场（76.47%）。说明这几种传统抗生素已经不适合再继续应用于猪肉生产链中进行细菌性疾病治疗。除了上述3种抗生素外，养猪场的粪肠球菌中，对青霉素、阿莫西林/克拉维酸、红霉素、恩诺沙星、庆大霉素、磺胺异恶唑、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、万古霉素、氟苯尼考、替米考星、利奈唑胺这11种抗生素的耐药率均高于其他环节的粪肠球菌，养猪场分离得到的粪肠球菌的耐药性更高。值得注意的是，有革兰氏阳性菌“最后一道防线”之称的利奈唑胺[17]，养猪场和屠宰场的粪肠球菌对其耐药率均高于50.00%，且在养猪场中发现了1株对青霉素具有耐药性的粪肠球菌，在养猪场和屠宰场中还各发现了2株和1株对万古霉素具有耐药性的粪肠球菌，且表现出较高的耐药性，如果这些菌株通过食物链传递给人类将产生较大危害。

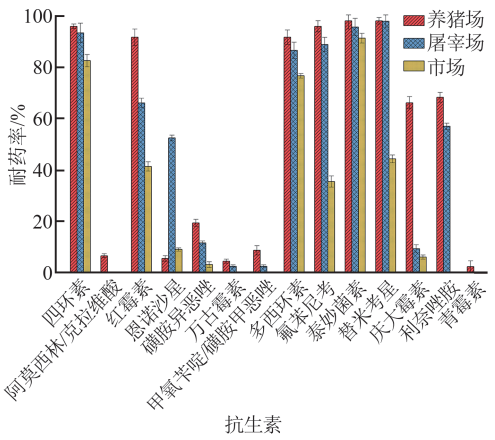


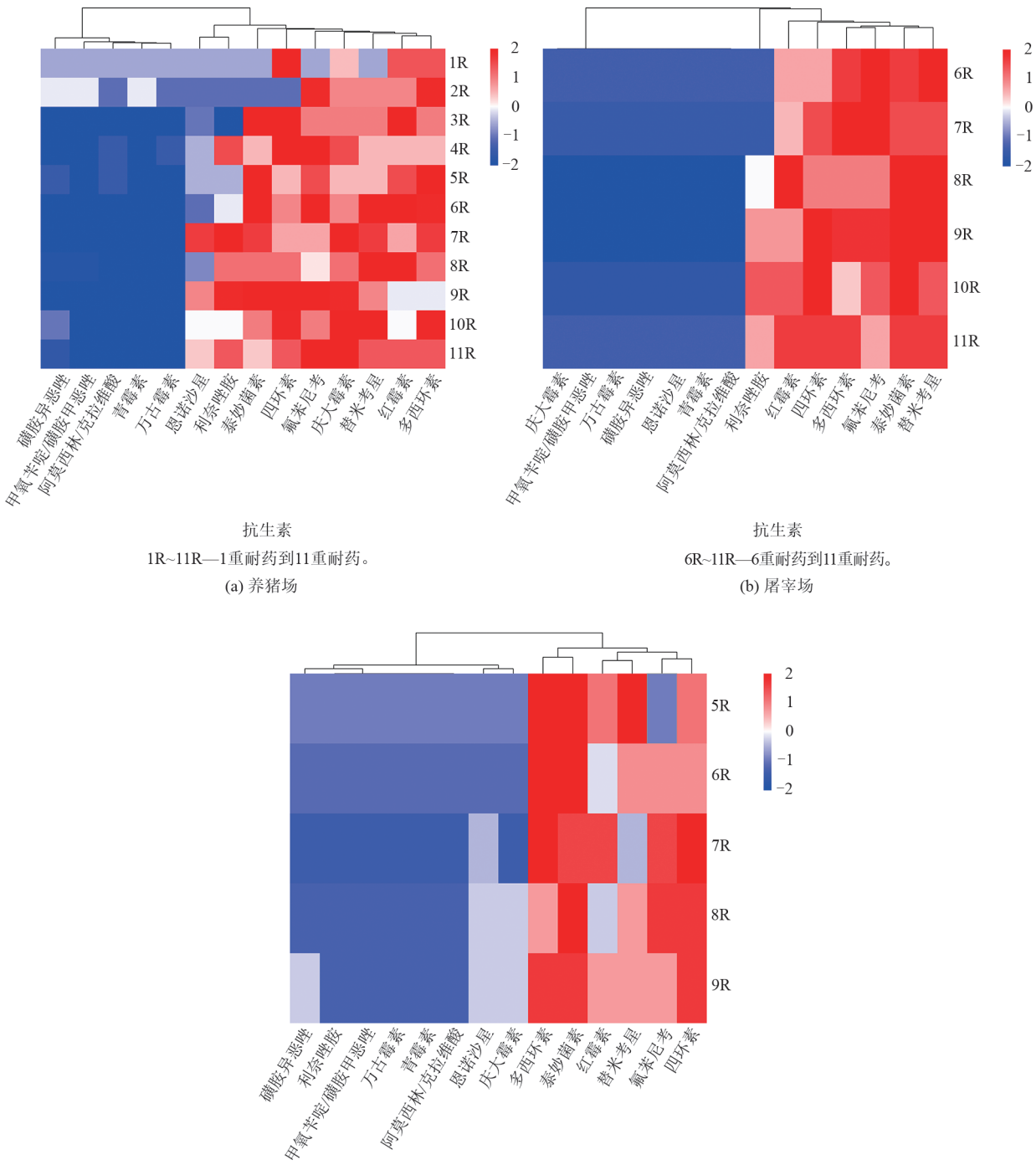
图1 各环节粪肠球菌分离株的抗生素耐药率

Fig. 1 Antibiotic resistance rate of *E. faecalis* in each link

2.3 各生产链中粪肠球菌的多重耐药性分析

不同环节的粪肠球菌多重耐药情况见图2。粪肠球菌对14种抗生素产生了1重到11重耐药，未发现12重及以上的耐药菌株。通过多重耐药性分析可知，具有5重耐药的市场粪肠球菌主要是对四环素、替米考星、泰妙菌素、红霉素和多西环素产生耐药性；以5重耐药谱为基础，7重耐药谱则是增加了氟苯尼考和恩诺沙星；8重耐药谱则是在7重耐药谱基础上，增加了庆大霉素；9重耐药谱则是在8重耐药谱基础上，增加了磺胺异恶唑。屠宰场粪肠球菌耐药重数为6重、7重、8重、9重和10重，主要是对氟苯尼

考、四环素、泰妙菌素、替米考星、红霉素和多西环素产生耐药性，具有8重耐药的粪肠球菌开始对利奈唑胺产生耐药性，且在具有9重耐药、10重耐药的耐药菌中，对利奈唑胺表现出更高的耐药性。养猪场粪肠球菌对14种抗生素的耐药程度更为丰富，其主要产生耐药性的抗生素种类也和前2个环节相似，且养猪场粪肠球菌主要是对利奈唑胺产生了9重及以上的耐药菌株。



抗生素

1R~11R—1重耐药到11重耐药。

(a) 养猪场

抗生素

6R~11R—6重耐药到11重耐药。

(b) 屠宰场

抗生素

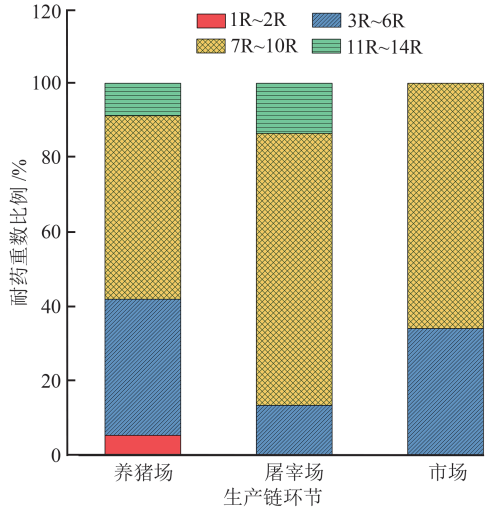
5R~9R—5重耐药到9重耐药。

(c) 市场

图2　各环节粪肠球菌多重耐药性热图

Fig. 2　Heat map of *E. faecalis* multidrug resistance in each link

如图 3 所示，不同环节来源的粪肠球菌以 7 重、8 重、9 重、10 重耐药为主，所占比例超过了 50%，总体耐药情况为：养猪场和屠宰场的耐药情况比市场的耐药情况更严重。



1R~14R—1重耐药到14重耐药。

图 3　各环节来源的粪肠球菌的多重耐药性比较

Fig. 3　Comparison of multidrug resistance of *E. faecalis* in each link

2.4　粪肠球菌的耐药基因检测结果

恶唑烷酮类抗生素耐药基因以 *optrA* 为主，其在养猪场、屠宰场和市场中的检出率分别为 74.47%、88.63%、17.65%；养猪场和屠宰场中，*poxtA* 检出率均低于 10.00%，分别为 8.51%、6.82%，市场未检测出 *poxtA*；3 个环节均未检出 *cfr*，说明 *optrA* 是粪肠球菌对利奈唑胺产生耐药性的关键基因。酰胺醇类耐药基因以 *optrA* 和 *fexA* 为主，养猪场、屠宰场、市场分别检测出了 32 株、20 株、12 株粪肠球菌携带 *fexA*，说明 *optrA*+*fexA* 基因型是粪肠球菌对酰胺醇类抗生素氟苯尼考产生耐药性的主要机制[18-20]。此外，养猪场中 *fexB* 和 *floR* 的检出率分别为 4.26%、4.55%，屠宰场中 *exB* 和 *floR* 的检出率分别为 6.38%、2.27%，市场中尚未检测出 *fexB* 和 *floR*。共检测出 44 株含有林可胺类-截短侧耳类-链阳霉素 A 类耐药基因 *lsa*（*E*）的粪肠球菌，总检出率为 35.20%，其中养猪场 30 株、屠宰场 9 株、市场 5 株，市场的检出率最低。分别在 82 株和 68 株粪肠球菌中检测到了四环素类耐药基因 *tet*（*M*）和 *tet*（*L*），并且 *tet*（*M*）和 *tet*（*L*）在养猪场中的检出率均在 85.00% 以上，高于屠宰场和市场，这进一步表明了粪肠球菌的耐药性随生产链逐渐降低。养猪场和屠宰场中，大环内酯类耐药基因 *erm*（*B*）的检出率差别较小，分别为 87.23% 和 86.36%，市场的检出率最低，为 47.06%。由图 4 可知，在养猪场粪肠球菌中检出的 10 种耐药基因中，有 7 种耐药基因的检出率高于屠宰场和市场，分别为 *poxtA*、*fexA*、*floR*、*lsa*（*E*）、*tet*（*M*）、*tet*（*L*）、*erm*（*B*）。另外，屠宰场粪肠球菌的 *optrA* 和 *fexB* 的检出率高于养猪场和市场。根据耐药基因的检出率分布，耐药基因在养猪场粪肠球菌的检出率更高，养猪场粪肠球菌相比于其他 2 个环节表现出更高的耐药性。

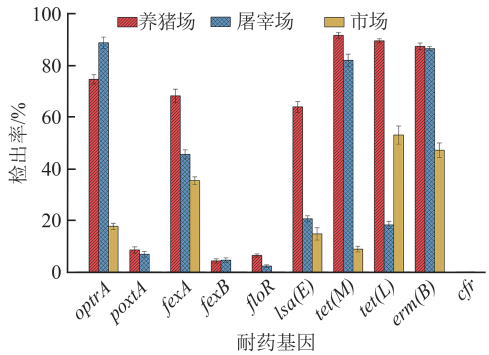


图 4　各环节粪肠球菌的耐药基因检出率

Fig. 4　Detection rate of antibiotic resistance genes of *E. faecalis* in each link

2.5　粪肠球菌毒力基因的分布差异

粪肠球菌的致病性是由多种毒力基因和多重耐药性协同作用的结果[21]，因此，粪肠球菌携带的毒力基因对肉类食品安全至关重要。心内膜炎抗原（efaA）是一种具有黏附作用的脂蛋白，是引起感染性心内膜炎的主要致病因子之一[22]。表面蛋白（esp）位于粪肠球菌表面，有利于其在宿主细胞的定植和黏附[23]。胶原蛋白黏附素（ace）位于肠球菌表面，主要通过介导粪肠球菌对黏附蛋白的黏附作用而引起感染[24]。*gelE* 基因编码的明胶酶是一种含锌的金属蛋白酶，可以使细菌向周围扩散，进一步促进炎症的发生[25]。溶血素（cyl）能使红细胞溶解并释放出血红蛋白，有助于促进细菌毒力[26]。

对 3 个环节分离到的 125 株粪肠球菌进行毒力基因筛查，其中 *efaA* 的检出率最高，达到 56.80%（71 株），其他依次为 *gelE*（48.80%，61 株）、

asal（46.40%，60 株）、*ace*（40.80%，51 株）、*cylA*（22.40%，28 株）、*hyl*（10.40%，13 株）、*esp*（4.80%，6 株）。如图 5 所示，*efaA* 在养猪场、屠宰场、市场的检出率分别为 65.96%（31 株）、56.82%（25 株）、44.12%（15 株），而 *esp* 的检出率较低，在养猪场和屠宰场的检出率分别为 8.51%（4 株）、2.27%（2 株），市场未检测到携带毒力基因 *esp* 的粪肠球菌。养猪场和屠宰场粪肠球菌的 *gelE* 的检出率分别为 51.06%、50.00%，高于市场粪肠球菌（44.12%）。*asal* 在养猪场粪肠球菌的检出率为 57.45%，高于屠宰场（43.18%）和市场（35.29%）。*cylA* 基因在屠宰场粪肠球菌中的检出率为 29.55%，高于养猪场（25.53%）和市场（8.82%）。*ace*、*hyl* 的检出率均表现为养猪场高于屠宰场和市场。从毒力基因筛查的整体情况来看，养猪场最高，屠宰场次之，市场最低，这可能与携带毒力基因的粪肠球菌沿食物链的传播特性有关。此外，研究发现，在对泰妙菌素、四环素和多西环素有耐药性的粪肠球菌及携带 *optrA* 的粪肠球菌中，大多携带了 *efaA*、*gelE*、*asal* 或 *ace* 基因，推测这几个基因与耐药菌的致病力有关，这与章婧等[27]的研究结果相似。

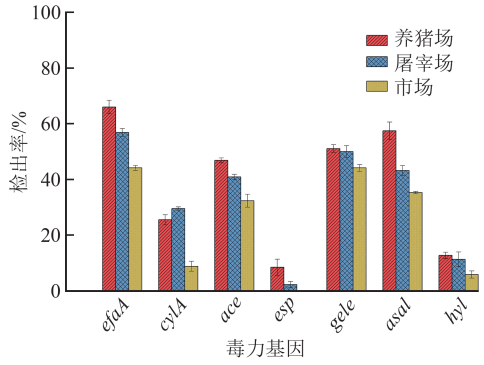


图 5　各环节粪肠球菌分离株毒力基因检出率

Fig. 5　Detection rate of virulence genes of *E. faecalis* in each link

2.6　粪肠球菌 MLST 分型

通过对 30 株 *optrA* 阳性粪肠球菌进行 MLST 分析，研究恶唑烷酮耐药粪肠球菌不同菌株间的进化及亲缘关系，推断 *optrA* 耐药基因在粪肠球菌中的传播机制。如表 3 所示，不同分离株的 ST 型粪肠球菌分布较分散，30 株粪肠球菌共有 19 种 ST 型，其中优势 ST 型为 ST714 型（5 株），其次为 ST16 型（3 株），其余 ST 型包含 1 株或 2 株粪肠球菌。

表 3　30 株 *optrA* 阳性粪肠球菌的 MLST 分析结果

Table 3　MLST typing results of 30 *E. faecalis* strains with optrA gene

菌株编号	基因型	ST 型
F1-2	*optrA*	ST714 型
F1-6	*optrA*	ST714 型
F1-19	*optrA*	ST506 型
F2-46	*optrA*	ST618 型
F2-51	*optrA*	ST167 型
F2-68	*optrA*	ST480 型
S-8	*optrA*	ST714 型
S-44	*optrA*	ST75 型
S-78	*optrA*	ST744 型
M1-2	*optrA*	ST506 型
M1-14	*optrA*	ST631 型
M1-17	*optrA*	ST116 型
M2-63	*optrA*	ST632 型
M2-71	*optrA*	ST452 型
M2-79	*optrA*	ST69 型
F1-20	*poxtA*	ST100 型
F1-28	*poxtA*	ST16 型
F2-69	*poxtA*	ST287 型
F2-84	*poxtA*	ST632 型
S-80	*poxtA*	ST5 型
S-93	*poxtA*	ST714 型
M1-43	*poxtA*	ST116 型
M1-51	*poxtA*	ST714 型
M2-80	*poxtA*	ST16 型
M2-103	*poxtA*	ST300 型
F1-34	*optrA+poxtA*	ST653 型
F2-50	*optrA+poxtA*	ST256 型
S-77	*optrA+poxtA*	ST506 型
M1-55	*optrA+poxtA*	ST16 型
M2-110	*optrA+poxtA*	ST727 型

MLST 分析结果表明，*optrA*、*poxtA* 以及 *optrA+poxtA* 这 3 种基因型的粪肠球菌在同一环节或不同环节间存在少量克隆菌株，但大多数菌株的 ST 型都不相同，表明水平传播可能是恶唑烷酮类耐药基因 *optrA* 在猪源粪肠球菌中流行的主要机制。

2.7 粪肠球菌耐药性的转移

水平传播是恶唑烷酮耐药基因在猪源粪肠球菌中流行的主要原因，有一类序列被称为可移动基因元件，其主要包括小于细菌染色体的插入序列、转座子、整合子和质粒等基因元件，可以使细菌的耐药基因在种内、种间甚至细菌和真菌间传播，在较大程度上促进了多重耐药菌的产生与传播[28-29]。对 20 株 *optrA* 阳性菌株进行接合转移试验，结果如表 4 所示。其中 12 株接合转移成功，表明部分菌株的 *optrA* 基因位于质粒上，并可以通过接合转移进行传播。转移频率最高的是 F1-19，为 5.8×10^{-4}；转移频率最低的是 S-44，仅为 2.3×10^{-6}。结果表明，质粒、整合子等可移动元件的存在会促进耐药基因的水平传播，因此在养殖、屠宰、运输、贮存和销售的过程中，需要注意恶唑烷酮耐药基因可能通过接合转移的方式相互传播，造成交叉污染，进而危害人类健康。对这 12 株接合子和 JH2-2 进行药物敏感性检测，结果表明接合子对氟苯尼考、利奈唑胺呈现出耐药性的增强，说明 *optrA* 耐药基因在受体菌株中可发挥其功能。

表 4 *optrA* 阳性菌接合转移情况及药物敏感性试验

Table 4 Conjugational transfer and antimicrobial susceptibility of *optrA*-positive isolates

菌株编号	最小抑菌质量浓度/(μg/mL)				转移频率
	利福平	氟苯尼考	夫西地酸	利奈唑胺	
F1-2	1	64	8	2	
F1-2-JH2-2	>512	32	>512	2	4.3×10^{-5}
F1-6	1	32	8	4	
F1-6-JH2-2	>512	32	>512	4	3.2×10^{-6}
F1-19	1	128	8	16	
F1-19-EC600	>512	32	>512	8	5.8×10^{-4}
F1-34	1	32	8	8	
F1-34-JH2-2	>512	16	>512	4	4.6×10^{-5}
F2-46	1	32	8	2	
F2-46-JH2-2	>512	8	>512	2	6.8×10^{-6}
F2-51	1	512	8	8	
F2-51-JH2-2	>512	128	>512	4	1.2×10^{-5}
F2-68	1	64	8	8	
F2-68-JH2-2	>512	32	>512	4	4.7×10^{-5}
S-44	1	32	8	8	
S-44-JH2-2	>512	16	>512	4	2.3×10^{-6}
S-78	1	32	8	4	
S-78-JH2-2	>512	16	>512	2	7.2×10^{-6}
M1-14	1	32	8	2	
M1-14-JH2-2	>512	8	>512	2	4.3×10^{-5}
M1-43	1	64	8	8	
M1-43-JH2-2	>512	16	>512	4	3.2×10^{-5}
M2-110	1	128	8	8	
M2-110-JH2-2	>512	64	>512	4	2.6×10^{-6}
JH2-2	>512	4	>512	1	

注：“空白”表示无此项。

3 结论

作者从 300 份猪肉源样品中分离鉴定出 125 株粪肠球菌，对其表型与基因型进行鉴定，发现粪肠球菌对猪肉生产链中常用的四环素、大环内酯、恶唑烷酮、磺胺类抗生素具有较高的耐药率。从多重耐药性来看，其耐药性的严重程度依次是养猪场、屠宰场和市场。*optrA*、*fexA*、*tet*(*L*)、*tet*(*M*)、*erm*(*B*)在 3 个环节中均有较高的检出率。毒力基因筛查结果表明，*efaA* 的检出率最高，*esp* 最低，且这 2 个基因在养猪场中的检出率高于屠宰场和市场。MLST 分析表明，水平传播是恶唑烷酮类耐药基因 *optrA* 在浙江省杭州市猪源粪肠球菌中流行的主要机制。接合转移试验表明，部分菌株的 *optrA* 基因位于质粒上，能通过接合转移在菌株间进行水平传播。该研究表明，猪肉制品安全需从源头进行控制，且需要加强监管，以此来保障肉制品的食品安全和人体健康。

参考文献

[1] 曲志娜. 养殖场动物源细菌耐药性监测与风险控制[J]. 兽医导刊，2017(13)：10-12.
QU Z N. Monitoring and risk control of antibiotic resistance in bacteria from livestock farms[J]. Veterinary Orientation，2017(13)：10-12.(in Chinese)

[2] GRANDCLÉMENT C，SEYSSIECQ I，PIRAM A，et al. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes，the evaluation of organic micropollutant removal：a review [J]. Water Research，2017，111：297-317.

[3] 巴永兵，娄阳，赵飞，等. 水产品批发市场中抗生素抗性基因的污染分析[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(8)：800-806.
BA Y B，LOU Y，ZHAO F，et al. Research of the pollution

of antibiotic resistance genes in aquatic products wholesale market[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017,36(8):800-806.(in Chinese)

[4] 程晨,谭枝微,刘颖梅,等. 耐万古霉素肠球菌基因分型及耐药性分析[J]. 临床检验杂志,2019,37(7):504-507.
CHENG C, TAN Z W, LIU Y M, et al. Genotype and analysis of drug resistance for vancomycin resistant enterococci[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science,2019,37(7):504-507.(in Chinese)

[5] IGBINOSA E O, BESHIRU A. Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood[J]. Frontiers in Microbiology,2019,10:728.

[6] 孙雅如,李伟程,余中节,等. 基于全基因组关联分析研究粪肠球菌发酵食品分离株的耐药性[J]. 微生物学报,2019,59(1):113-122.
SUN Y R, LI W C, YU Z J, et al. Genome-wide association study on the antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from natural fermented food[J]. Acta Microbiologica Sinica,2019,59(1):113-122.(in Chinese)

[7] BADUL S, ABIA A L K, AMOAKO D G, et al. From the farms to the dining table: the distribution and molecular characteristics of antibiotic-resistant *Enterococcus* spp. in intensive pig farming in South Africa[J]. Microorganisms, 2021,9(5):882.

[8] 吴艺影,曲道峰,韩剑众. 猪肉生产链细菌耐药性及其耐药基因调查研究[J]. 中国畜牧杂志,2015,51(6):78-83.
WU Y Y, QU D F, HAN J Z. Investigation on antibiotic resistance and resistance genes in bacteria isolated from pork chain[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2015, 51(6):78-83.(in Chinese)

[9] 李楠,刘文森,徐静,等. 猪场环境中细菌分布情况及耐药性分析[J]. 中国兽医学报,2010,30(11):1456-1459.
LI N, LIU W S, XU J, et al. Distribution and drug resistance of bacteria in swine house environment[J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2010,30(11):1456-1459.(in Chinese)

[10] 黄金林,何蕊,许海燕,等. 猪肉加工、流通过程中主要食源性病原细菌的监测[J]. 中国食品学报,2006,6(6):121-125.
HUANG J L, HE R, XU H Y, et al. The surveillance of foodborne bacterial pathogens in pork processing and circulation processes[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(6): 121-125.(in Chinese)

[11] FIORITI S, MORRONI G, COCCITTO S N, et al. Detection of oxazolidinone resistance genes and characterization of genetic environments in enterococci of swine origin, Italy[J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 2021.

[12] MCGINNIS S, MADDEN T L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(Suppl. 2): W20-W25.

[13] TOOMEY N, BOLTON D, FANNING S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(2): 127-135.

[14] PREACHER K J, HAYES A F. SPSS and SAS procedures for estimating indirect effects in simple mediation models[J]. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers, 2004, 36(4): 717-731.

[15] 彭珍,刘书亮,凡琴,等. 主要动物性食品生产链大肠杆菌的耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(4):220-225.
PENG Z, LIU S L, FAN Q, et al. Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the production chains of main animal food[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(4): 220-225.(in Chinese)

[16] VIANA C, SERENO M J, PEGORARO K, et al. Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 310: 108310.

[17] 杨影影,易开放,张俊锴,等. 猪链球菌临床分离株对利奈唑胺的耐药性及耐药机制研究[J]. 河南农业科学,2022,51(1):141-145.
YANG Y Y, YI K F, ZHANG J K, et al. Research on linezolid resistance and mechanism in clinical isolates of *Streptococcus suis*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(1): 141-145.(in Chinese)

[18] YOON S, SON S H, KIM Y B, et al. Molecular characteristics of *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* from chicken meat in South Korea[J]. Poultry Science, 2020, 99(12): 6990-6996.

[19] ZHAO Q, WANG Y, WANG S L, et al. Prevalence and abundance of florfenicol and linezolid resistance genes in soils adjacent to swine feedlots[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32192.

[20] WANG Y, LV Y, CAI J C, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(8): 2182-2190.

[21] 王佳慧,贾丹,李贺海,等. 屎肠球菌携带毒力基因及其耐药性检测[J]. 中国兽医科学,2020,50(11):1428-1432.
WANG J H, JIA D, LI H H, et al. Detection of virulence genes and drug resistance of *Enterococcus faecium*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(11): 1428-1432.(in Chinese)

[22] LOW Y L, JAKUBOVICS N S, FLATMAN J C, et al. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2003, 52(2): 113-119.

[23] 阮卫,杨祚升,吴移谋,等. *esp*基因存在与粪肠球菌耐药的相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(1):5-7.
RUAN W, YANG Z S, WU Y M, et al. Expression situation of *esp* gene and analysis of relativity with *Enterococcus faecalis* resistance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008, 18(1): 5-7.(in Chinese)

[24] SOARES R O, FEDI A C, REITER K C, et al. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates[J]. Virulence, 2014, 5(5): 634-637.

[25] 黄奕雯,幸文定,陶政,等. 江西省猪源粪肠球菌毒力基因及耐药性分析[J]. 中国兽医学报,2018,38(3):476-480,514.
HUANG Y W, XING W D, TAO Z, et al. Detection and analysis of virulence genes and antibiotic resistence of porcine *E. faecalisin* Jiangxi[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(3): 476-480, 514.(in Chinese)

[26] VAN TYNE D, MARTIN M J, GILMORE M S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin[J]. Toxins, 2013, 5(5): 895-911.

[27] 章婧,蔡萍,贺奕卓,等. 广东省养禽场肠球菌耐药性及毒力因子流行分布特征[J]. 畜牧兽医学报,2021,52(9):2650-2659.
ZHANG J, CAI P, HE Y Z, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and virulence factors in enterococci from poultry farms in Guangdong Province[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(9): 2650-2659.(in Chinese)

[28] PARTRIDGE S R, KWONG S M, FIRTH N, et al, Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(4): e00088-17.

[29] PARTRIDGE S R, TSAFNAT G, COIERA E, et al, Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(4), 757-784.

(责任编辑:闫林红)