

DOI:10.13350/j.cjpb.220606

• 论著 •

一株杀白细胞素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子分型及肠毒素检测*

苏雅静¹, 乔霞¹, 康宇婷¹, 汪澎涛¹, 杨宁爱¹, 贾伟^{1,2}, 赵志军^{1,2*}

(1. 宁夏医科大学总医院, 宁夏临床病原微生物重点实验室, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院, 医学实验中心)

【摘要】 目的 对宁夏某医院临床分离的1株杀白细胞素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(PVL⁺ MRSA)菌株进行分子分型和肠毒素检测分析,以了解该菌株的遗传学特征。方法 按AxyPrep质粒小量制备试剂盒说明书提取细菌DNA,利用葡萄球菌染色体基因盒mec(staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec)分型、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)以及金黄色葡萄球菌表面蛋白A基因多态性分型(staphylococcus protein A, Spa)技术对PVL⁺ MRSA分离株进行分子分型。采用PCR法检测金黄色葡萄球菌7个管家基因(arcC, aroE, tpi, pta, glpF, gmk和yqiL),将测序结果与MLST数据库进行比对。采用微孔板酶联免疫法(ELISA)检测PVL⁺ MRSA分离株中5种传统肠毒素(staphylococcal enterotoxins A-E, SEA-SEE)的表达情况。结果 对PVL⁺ MRSA分离株进行SCCmec基因的多重PCR扩增,扩增产物经测序比对分析,确定该菌株为SCCmec IV a型。PCR扩增金黄色葡萄球菌7个管家基因后测序比对,获得PVL⁺ MRSA分离株的序列型(sequence types, STs)为ST 3191。PCR扩增spa基因并测序,测序结果与Spa Serve数据库比对,未检出PVL⁺ MRSA分离株的Spa型别(non-typeable, NT)。ELISA检测PVL⁺ MRSA分离株产B和C混合型葡萄球菌肠毒素。结论 PVL⁺ MRSA分离株的分子型为ST 3191-MRSA-SCCmec IV a型,且产B和C混合型葡萄球菌肠毒素,属于社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;分子分型;PCR;肠毒素

【中图分类号】 R378.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0649-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.;17(6):649-653, 659.]

Molecular characteristics and Staphylococcal enterotoxins of a Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive ethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates

SU Ya-jing¹, QIAO Xia¹, KANG Yu-ting¹, WANG Peng-tao¹, YANG Ning-ai¹, JIA Wei^{1,2}, ZHAO Zhi-jun^{1,2} (1. Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Laboratory Center of Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** The present study aimed to investigate the genetic characteristics of a Panton-Valentine leucocidin-positive (PVL⁺) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a hospital of Ningxia province through detection of molecular typing and staphylococcal enterotoxins. **Methods** Genomic DNA was extracted from *S. aureus* isolates PVL⁺ MRSA by AxyPrep Plasmid Miniprep Kit according to the manufacturer's instruction. The isolates PVL⁺ MRSA was then characterized for the determination of the molecular typing by staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing, multilocus sequence typing (MLST), and staphylococcus protein A (Spa) typing. We also used PCR assays to detect seven housekeeping genes (arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi, and yqiL) and, the result of the sequence was compared with the MLST database. Meanwhile, 5 traditional staphylococcal enterotoxins A-E (SEA-SEE) in isolates PVL⁺ MRSA were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Multiplex PCR method was done for the determination of SCCmec types and a fragment of 750 base pairs (bp) was amplified. The isolates PVL⁺ MRSA was identified as SCCmec IV a after testing and ontrasted sequence. MLST revealed the isolates PVL⁺ MRSA belonging to type ST 3191. The spa typing of the isolates PVL⁺ MRSA was not identified (non-typeable, NT) according to the sequenced and deduced using the Ridom Spa Server database. Further, ELISA howed the isolates PVL⁺ MRSA was found to produce enterotoxins type B and C. **Conclusion** The isolates PVL⁺ MRSA was ST 3191-MRSA-SCCmec IV a type, which belonging to community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (CA-MRSA).

* **【基金项目】** 宁夏自然科学基金项目(No. 2022AAC03548);第四批宁夏青年科技人才托举工程项目(No. TJGC2019089)。

** **【通讯作者】** 赵志军, E-mail: 937000560@qq.com

【作者简介】 苏雅静(1989-),女,宁夏人,硕士研究生,助理研究员,主要从事病原微生物耐药及免疫研究。E-mail: suyajing8022664@126.com

The enterotoxins SEB and SEC were produced in the isolates PVL⁺ MRSA.

【Key words】 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); molecular typing; PCR; staphylococcal enterotoxins

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是一种机会性致病菌,可引起浅表伤口感染或食物中毒甚至菌血症和其他全身感染,也是外科伤口医院获得性感染和与留置医疗器械相关感染的主要病原菌之一^[1-2]。金黄色葡萄球菌的多重耐药性严重,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),由于其传播途径广、耐药谱宽、致病性强及耐药性产生快等特点,已成为全球重要的公共卫生问题。MRSA感染是导致皮肤和软组织感染(skin and soft tissue infections, SSTIs)、肺炎、心内膜炎、血流感染(bloodstream infection, BSI)、骨髓炎以及毒素介导综合征等疾病的主要原因之一,病死率可达50%^[3-6]。

MRSA是全球院内感染重要致病菌,被称为医院获得性MRSA(healthcare-associated MRSA, HA-MRSA)。近年来MRSA感染的流行病学调查表明社区获得性MRSA(community-associated MRSA, CA-MRSA)逐年增多。CA-MRSA的一些菌株可能是从社区的医疗环境中感染的,Mammaia等^[7]的研究表明,CA-MRSA可能具有独特的流行病学、遗传组件、毒力成分及临床表现等。王敏^[8]报道,CA-MRSA毒性更强,传播迅速,可导致不同的临床症状。

CA-MRSA通常携带葡萄球菌染色体基因盒mec(staphylococcal chromosomal cassettes mec, SCCmec)IV或V,而HA-MRSA菌株多携带SCCmec I、II和III。多数CA-MRSA菌株携带杀白细胞素(Panton-Valentine leukocidin, PVL)基因,具有较强的致病力,而HA-MRSA菌株一般不携带这种毒力基因^[9-10]。PVL是金黄色葡萄球菌重要的毒力因子之一,由lukS-PV和lukF-PV两个基因编码共同转录。PVL是synergohymenotropic toxin(SHT)家族的成员,可诱导细胞膜上的孔隙,损伤细胞膜。相对于HA-MRSA,CA-MRSA通常只对β-内酰胺类抗生素耐药。近年来,CA-MRSA和HA-MRSA的相关感染正在发生双向交叉,社区感染由HA-MRSA克隆引起,而住院患者感染由CA-MRSA克隆引起^[11]。除感染外,金黄色葡萄球菌还与毒素介导的食物中毒有关。肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)为引发葡萄球菌性食物中毒和食源性疾病的主要毒力因子,具有超抗原活性且高度耐热,能激活促炎细胞因子和趋化因子的生成,导致发热、低血压和休克,并能增强金黄色葡萄球菌的侵袭性和致病力。伍晔晖等^[12]和Mun等^[13]报道葡萄球菌性食物中毒多由staphylococcal enterotoxins

A-E(SEA-SEE)5种的经典SEs引起的。

流行病学是研究克隆性、进化途径、病原体遗传多样性和金黄色葡萄球菌感染传播的重要组成部分。多种分子分型方法可用于MRSA分离株的分型,包括SCCmec分型、多位点序列分型(multi-locus sequence typing, MLST)及葡萄球菌A蛋白(staphylococcal protein A, Spa)分型等。本研究通过SCCmec分型、MLST分型及Spa分型对临床分离的1株杀白细胞素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(PVL⁺ MRSA)菌株进行分子分型,同时对其肠毒素进行检测分析以了解该菌株的遗传学特征。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株来源 从宁夏某医院临床分离的金黄色葡萄球菌中筛选得到1株杀白细胞素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(PVL⁺ MRSA)菌株,该菌株分离自一急性化脓性乳腺炎患者的脓液标本。

1.2 主要试剂与仪器 质粒DNA小量试剂盒购自美国AxyPrep公司;RIDASCREEN® SET A、B、C、D、E金黄色葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒购自德国R-Biopharm公司;DL2000 DNA Marker, DL1000 DNA Marker及DL500 DNA Marker均购自日本Takala公司;脑心浸出液肉汤(BHI), 2×Taq PCR Master Mix购自北京天根生化科技有限公司;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。PCR扩增仪MyCycler,通用电泳仪及CHEMI DOC MP多色荧光凝胶成像系统购于美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 基因组DNA提取 将菌株接种至LB固体培养基,于37℃培养过夜,挑取单个菌落接种于100 ml液体培养基中,37℃振荡培养过夜增菌。按照AxyPrep质粒小量制备试剂盒说明书提取细菌DNA,使用NanoDrop 2000分光光度计检测DNA浓度和纯度,于-20℃保存。

2.2 SCCmec分型 多重PCR扩增目标序列,PCR反应体系(25 μl),模板5 μl,引物序列见表1。反应条件:93℃预变性7 min;93℃变性55 s,64℃退火50 s,72℃延伸120 s,共10个循环;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸120 s,共25个循环;72℃延伸10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后由昆泰锐(武汉)生物公司测序,测序结果比对分析后确定SCCmec型别。

2.3 Spa 分型 Spa 分型主要是基于 spa 基因 X 区重复序列的多态性。PCR 扩增 spa 目标序列,引物序列见表 1。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定,由昆泰锐(武汉)生物公司测序。测序结果上传至 Spa Serve 数据库 (<http://www.spaserver.ridom.de/>),根据串联重复序列排列方式及次数确定菌株 spa 型别,不能被归为任何已知 spa 类型的 SA 被定义为不可分型(NT)。

表 1 目的基因扩增引物
Table 1 Primer sequence of target gene

目的基因 Target gene	引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度(bp) Product size
SCCmec I	Type I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	613
	Type I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	
SCCmec II	Type II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398
	Type II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC	
SCCmec III	Type III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280
	Type III-R	CCTTAGTTGTGCGTAACAGATCG	
SCCmec IVa	Type IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776
	Type IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCC	
SCCmec IVb	Type IVb-F	TCTGGAATTAATTCAGCTGC	493
	Type IVb-R	AAACAATAATGCTCTCCCTC	
SCCmec IVc	Type IVc-F	ACAATATTGTATTATCGGAGAGC	200
	Type IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG	
SCCmec IVd	Type IVd-F	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881
	Type IVd-R	TGCTCCAGTAATGCTAAAAG	
SCCmec V	Type V-F	GAACATGTTACTTAAATGAGCG	325
	Type V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACAC	
arcC	arcC-F	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC	456
	arcC-R	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
aroE	aroE-F	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	aroE-R	GGTGTGTATTATAAATACGATATC	
glpF	glpF-F	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
	glpF-R	CTAGGAACGCAATCTTAATCC	
gmk	gmk-F	ATCGTTTTATCGGGACCATC	417
	gmk-R	TCATTAACATACAACGTAATCGTA	
pta	pta-F	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	pta-R	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
tpi	tpi-F	TCGTTCAITCTGAACGTCGTGAA	402
	tpi-R	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	
yqiL	yqiL-F	CAGCATAACAGACACCTAATGGC	516
	yqiL-R	CGTTGAGGAATCGAIACTGGAAC	
spa	spa-F	AGACGATCCTTCGGTGAGC	168
	spa-R	CAGCAGTAGTGCCGTTTG	

2.4 MLST 分型 从 MLST 数据库 (<http://www.mlst.net/>) 获得 7 个管家基因 (*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqiL*) 的引物序列(表 1)。分别扩增目标序列。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,55 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 90 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5 % 琼脂糖电泳鉴定,对 7 个管家基因片段进行测序,拼接剪切后上传

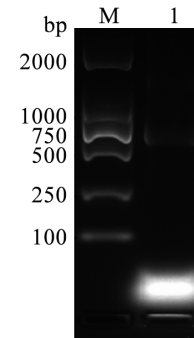
到 MLST 数据库进行比对,确定菌株的 7 个管家基因的等位基因编号,根据等位基因编号获得特异的 ST 型别。

2.5 肠毒素检测和分型 使用 BHI 脑心浸出液肉汤隔夜增菌,使其产肠毒素。采用夹心酶联免疫法对 SEA-SEE 肠毒素进行分型,按照金黄色葡萄球菌肠毒素检测分型试剂盒说明书操作,微孔板 A-E 孔和 H 孔分别包被有针对葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D 和 E 的特异性抗体。F 和 G 孔包被有针对无免疫动物的抗体(阴性质控)。按微孔板架上的标记由 A 向 G 孔里加入处理好的菌液,加入阳性质控至孔 H。35~37 °C 孵育 1 h 后,洗涤 3 次;加入酶连接物 1(标记葡萄球菌肠毒素抗体);同上孵育和洗涤;加入酶连接物 2(过氧化物酶标记的检测分子),孵育后洗涤 3 次;加入底物/发光剂作用后,加入终止液,测 A₄₅₀ 值。

结果

1 SCCmec 分型

通过多重 PCR 扩增 PVL⁺ MRSA 分离株的 SCCmec 基因型,扩增的目的片段约 750 bp(图 1),经测序比对分析,确定该菌株为 SCCmec IVa 型。



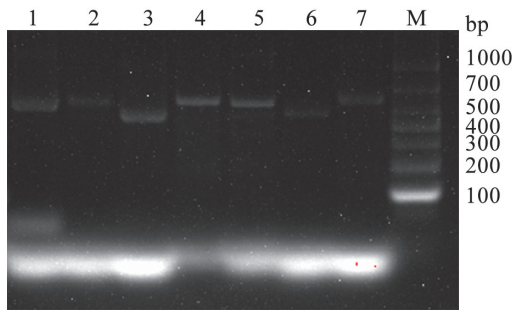
M DNA 标志物(DL2000) 1 PVL⁺ MRSA PCR 产物
图 1 PVL⁺ MRSA 的 SCCmec 分型多重 PCR 鉴定
M DNA marker(DL2000) 1 PCR product of PVL⁺ MRSA
Fig. 1 Multiplex PCR for SCCmec typing of *S. aureus* isolates PVL⁺ MRSA

2 MLST 分型

PVL⁺ MRSA 分离株的 7 对管家基因引物 PCR 扩增结果见图 2。PCR 产物测序结果与 MLST 数据库比对,确定菌株的 7 个管家基因的等位基因编号,结果见表 2。根据等位基因编号得出该菌株的 MLST 型别为 ST 3191。与数据库比对后确定该菌株为菌株 14422,菌株信息:中国深圳,2015。

3 Spa 分型

PCR 扩增 PVL⁺ MRSA 分离株 spa 基因,目的片段约 168 bp(图 3)。PCR 产物测序后与 Spa 分型数据库比对,未检出 spa 型别(NT)。



M DNA 标志物(DL1000) 1 *arcC* 基因 PCR 产物 2 *aroE* 基因 PCR 产物 3 *tpi* 基因 PCR 产物 4 *pta* 基因 PCR 产物 5 *glpF* 基因 PCR 产物 6 *gmK* 基因 PCR 产物 7 *yqiL* 基因 PCR 产物

图 2 PVL⁺ MRSA 管家基因 PCR 鉴定

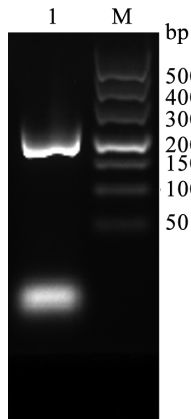
M DNAMarker(DL1 000) 1 PCR product of *arcC* 2 PCR product of *aroE* 3 PCR product of *tpi* 4 PCR product of *pta* 5 PCR product of *glpF* 6 PCR product of *gmK* 7 PCR product of *yqiL*

Fig. 2 Identification of the housekeeper genes of *S. aureus* isolates PVL⁺ MRSA by PCR

表 2 PVL⁺ MRSA 的 MLST 分型

Table 2 MLST typing of *S. aureus* isolates PVL⁺ MRSA

菌株 Strain	ST 型 ST	管家基因 Housekeeper genes						
		<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gmK</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	<i>glpF</i>
14422	3191	19	23	2	19	347	15	15



M DNA 标志物(DL500) 1 *spa* 基因 PCR 产物

图 3 PVL⁺ MRSA 的 *spa* 基因 PCR 鉴定

M DNA marker(DL500) 1 PCR product of *spa*

Fig. 3 Identification of *spa* in *S. aureus* isolates PVL⁺ MRSA by PCR

4 肠毒素检测分型

对 PVL⁺ MRSA 分离株进行葡萄球菌肠毒素的检测和分型,结果见表 3。该菌株产葡萄球菌肠毒素 B 和 C,不产葡萄球菌肠毒素 A、D、E。

讨论

与 HA-MRSA 菌株相比,CA-MRSA 菌株的毒力和适应性更强,CA-MRSA 更能逃避中性粒细胞的吞噬。CA-MRSA 毒力增加的原因为 CA-MRSA 从可移动元件上获得 PVL、SEs 等毒力基因,且 CA-MRSA

能促进核心基因组编码毒力基因的表达,如 α-毒素(hemolysin alpha toxin, Hla)、α-型苯酚可溶蛋白(phenol-soluble modulins α, PSMα)等。大多金黄色葡萄球菌均携带这些毒力基因,但不同毒素基因的表达水平不同可表现出不同的致病性^[10],尤其是 PSMα 和 Hla 对 CA-MRSA 疾病进展起决定性作用。PVL 是金黄色葡萄球菌重要的外毒素,可溶解中性粒细胞,破坏人体防御系统。此外,如果 PVL 阳性菌株高表达 *spa* 则会增加 PVL 对中性粒细胞的裂解能力。携带有 PVL 基因的细菌毒力较强,常与化脓性的皮肤感染、蜂窝组织炎及坏死性肺炎等密切相关。夏雯^[14] 和等冯秀丽^[15] 研究报道 HA-MRSA 的 PVL 基因携带率约为 5%,而 CA-MRSA 的 PVL 基因携带率则为 77%~100%。

表 3 PVL⁺ MRSA 的产毒状况

Table 3 PVL⁺ MRSA in all types of staphylococcal enterotoxins detection

肠毒素 Staphylococcal enterotoxins	结果 SE detected
SEA	-
SEB	+
SEC	+
SED	-
SEE	-

注:“+”表示肠毒素检测阳性,“-”表示肠毒素检测阴性

Note:“+” a positive for SEs,“-” a negative for SEs

SCCmec 是 MRSA 中普遍存在的一种可移动遗传元件,对多重耐药性起重要作用。SCCmec 元件包含有 *mec* 基因簇、染色体重组酶(*ccr*)基因簇及 3 个可变区(J 区),其中 *mecA* 基因介导了 β-内酰胺类药物的耐药性,而 J 区因常常携带一些抗生素耐药决定簇(Tn554, pT181, PUB110 等),使得 SCCmec 元件表达更多的耐药表型。J 区的多态性决定了 SCCmec 的长度和大小,可作为 SCCmec 元件亚型分类的标准^[16-18]。对 SCCmec 的分析研究可为区分 HA-MRSA 和 CA-MRSA 提供分子依据。本研究对 PVL⁺ MRSA 分离株进行了 SCCmec 分型,结果显示该菌株为 SCCmec IV a 型。SCCmec IV 和 V 型同属于 CA-MRSA。SCCmec 主要流行型别分布呈地域性和动态性。中国、美国、新加坡及澳大利亚以 SCCmec III 型为主,而日本和韩国则以 SCCmec II 为主^[19-20]。曾凌等的^[21] 研究表明江西地区以 SCCmec IV a 为优势型,占 66.67%;而 SCCmec III 则占 15.19%。此外,美国和加拿大流行的 USA300 和 USA400、韩国流行的 USA700,以及荷兰流行的 USA300 和 USA1000 均为 SCCmec IV 型,英国流行的 EMRSA-15 为 SCCmec V 型^[18]。近年研究发现 10%~80% 的院内感染菌株具有 CA-MRSA 的分子特征^[5]。CA-MRSA 通常携带

较小的 SCCmec IV 和 V 型的元件,具备更便捷的转移性和更强的适应性,更容易在不同遗传背景中的菌株中转移^[10]。

MLST 是基于管家基因序列而确定分子流行克隆,MLST 产生的数据可用于细菌的进化和种群研究,而不考虑其多样性及种群结构的演化。MLST 分型研究较好地说明细菌属中的菌株间遗传亲缘关系,确定基因重组及突变相关进化的重要性以及基因水平转移事件在进化过程中的重要作用^[22-23]。MRSA 地域差异性大,不同国家和地区间的 ST 型不同。ST5 和 ST239 是我国 HA-MRSA 较常见的 ST 型别,而 ST59 和 ST398 则多为 CA-MRSA 的主要型别。在美国,ST8(USA300)和 ST121 是较常见的类型^[24]。此外,我国不同城市金黄色葡萄球菌的分子特征也不同,大连、沈阳以 ST5 为主,成都以 ST59 为主,温州以 ST7、ST188 为主,而宁夏地区主要流行菌株尚不清楚。经与数据库比对后确定 PVL⁺ MRSA 分离株的 MLST 型别为 ST3191。相对于 SCCmec II、III 型菌株 ST 分型的高度克隆一致性,SCCmec IV 和 V 型菌株中则存在多种 ST 分型,并且分子质量越小的 SCCmec 相关的 ST 分型类别越多^[5]。

金黄色葡萄球菌 MLST 型与肠毒素存在一定的相关性,如 ST5 产葡萄球菌肠毒素 C、D、E;ST6 产葡萄球菌肠毒素 A、D、E;ST59 产葡萄球菌肠毒素 B、C;ST15 产葡萄球菌肠毒素 E^[25-26]。本研究中的 PVL⁺ MRSA 分离株产葡萄球菌肠毒素 B 和 C,与 ST59 产毒状况一致。

Spa 分型和 MLST 具有高度一致性,通常可通过比较 Spa 分型和 MLST 结果研究金黄色葡萄球菌的分子流行病学特征^[18]。Spa 分型仅依赖于对金黄色葡萄球菌 A 蛋白 X 区重复序列的多态性的评估,能有效的区分不同的克隆株。该方法快速、经济、重复性好,且具有标准化的命名法^[27-29]。Spa-t437 为 CA-MRSA 和 HA-MRSA 的主要克隆株^[21],但本研究未检出 PVL⁺ MRSA 分离株的具体型别。

了解感染菌株的分子流行病学,对于有针对性地指导 MRSA 的防治具有重要意义。而利用分子分型技术监测 MRSA 克隆,对菌株溯源识别至关重要。本研究揭示了 PVL⁺ MRSA 分离株的分子流行病学特征和肠毒素产毒状况,为其感染的防治提供参考依据。

【参考文献】

[1] Strau L, Stegger M, Akpaka PE, et al. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(49): E10596-604.
[2] Bhatta DR, Cavaco LM, Nath G, et al. Association of Pantone Valentin Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staph-*

lococcus aureus (MRSA) in Western Nepal; a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study) [J]. BMC Infect Dis, 2016, (16): 199.
[3] 洪捷, 曹阳, 谈忠鸣, 等. 江苏地区金黄色葡萄球菌耐药及分子分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(7): 604-609.
[4] Prospero M, Salemi M, Azarian T, et al. Unexpected predictors of antibiotic resistance in housekeeping genes of *Staphylococcus aureus* [J]. ACM BCB, 2019, 10(9): 259-268.
[5] Sit PS, Teh CS, Idris N, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 274.
[6] 曹江红. 社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌的分子特征及毒力因子研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
[7] Mammina C, Cala C, Bonura C, et al. Polyclonal non multiresistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical cases of infection occurring in Palermo, Italy, during a one-year surveillance period [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2012(11): 17.
[8] 王敏. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子流行病学及临床感染特征的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
[9] 杨琴, 郑跃杰, 文飞球, 等. 深圳住院患儿 MRSA 的分子分型和耐药性 [J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(7): 802-806.
[10] 赖奋强, 郭庆昕, 杨滨, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌杀白细胞素基因检测 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(8): 726-731.
[11] Antiabong JF, Kock MM, Maphanga TG, et al. Trends in the genetic background of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a south african hospital; an institutional-based observational study [J]. Open Microbiol J, 2017, 11(1): 339-351.
[12] 伍晔晔, 孟庆玲, 乔军, 等. 奶牛源金黄色葡萄球菌新疆分离株生物被膜、肠毒素基因与毒力的检测及其相关性分析 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(11): 2693-2698.
[13] Mun YS, Hwang YJ. Novel spa and Multi-Locus Sequence Types (MLST) of *Staphylococcus aureus* samples isolated from clinical specimens in Korean [J]. Antibiotics (Basel), 2019, 8(4): E202.
[14] 夏雯, 吴亮, 阴晴, 等. 某院 ICU 医院获得性肺炎患者痰分离 MRSA 耐药基因和 pvl 基因携带情况 [J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(6): 525-530.
[15] 冯秀丽, 杨璐嘉, 张楚楚. 49 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性分析及 pvl 基因检测 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11): 1807-1810.
[16] Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(18): 3057-3071.
[17] 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(2): 109-117.
[18] 刘明雷, 高春燕, 董爱英. 82 株儿童 CA-MRSA SCCmec 分型及耐药性研究 [J]. 中国热带医学, 2017, 17(2): 130-134.
[19] 刘静. 金黄色葡萄球菌分子特征及耐药相关分子标志 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.

- hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis[J]. Parasitol, 2005, 27(4): 139-146.
- [18] El Gengehi N, El Ridi R, Tawab NA, et al. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin[J]. J Parasitol, 2000, 86(5): 993-1000.
- [19] 唐崇惕, 崔贵文, 钱玉春. 内蒙古呼伦贝尔草原泡状棘球蚴病病原的调查[J]. 动物学报, 1988, 32(2): 172-179.
- [20] 王培培, 韩榕. 利用不依赖连接反应的克隆方法构建 pCHF3-MAP65-1-YFP 和 pCHF3-MAP65-2-YFP 表达载体[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2): 266-270.
- [21] Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO. Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all"[J]. J Biol Chem, 1983, 258(18): 11267-11273.
- [22] Zhao L, Shao S, Chen Y, et al. *Trichinella spiralis* Calreticulin Binds Human Complement C1q As an Immune Evasion Strategy [J]. Front Immunol, 2017(8): 636.
- [23] 陈路娟, 程喆, 王彦海, 等. 多房棘球绦虫钙网蛋白的真核表达及其 T、B 细胞表位预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1397-1403.
- [24] 陈晓娟, 闫少春, 邵国. 蛋白表达系统的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2014, 30(3): 142-143.
- [25] 马亮, 刁玉梅, 任保彦, 等. 弓形虫 RH 株表面抗原 SAG3 去信号肽基因的蛋白原核表达及鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1): 104-108.
- [26] Oladiran A, Belosevic M. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(4): 396-405.

【收稿日期】 2022-02-07 【修回日期】 2022-04-19

(上接 653 页)

- [20] 杨延成, 程航, 周人杰, 等. SCCmec 遗传元件及其在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子分型中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(5): 442-451.
- [21] 曾凌, 邓琼, 刘洋, 等. 2017-2018 年江西地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行特征[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(9): 835-841.
- [22] 胡璐璐, 李迎慧, 路滢, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多位点序列分型与耐药性研究[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(3): 289-292.
- [23] 王艳, 周丽萍, 巢国祥, 等. 金黄色葡萄球菌 MRSA 分型及分子溯源研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 2899-2904, 907.
- [24] Li X, Huang T, Xu K, et al. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 873.
- [25] 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(5): 449-456.
- [26] 吕国平, 李亚子, 郭玉梅, 等. 金黄色葡萄球菌食物中毒株遗传特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(2): 185-188.
- [27] 袁梦, 黄汉伟, 胡鹏威, 等. 2009-2015 年深圳市不同来源样本中金黄色葡萄球菌毒力耐药特征及分子分型研究[J]. 实用预防医学, 2019, 26(4): 420-426.
- [28] 张婧, 张易, 施春雷. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因及其表达检测[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 246-251.
- [29] 袁梦, 袁月明, 罗锦雁, 等. 金黄色葡萄球菌毒力基因检测及 Spa 分型研究[J]. 疾病监测, 2016, 31(7): 603-608.

【收稿日期】 2022-01-07 【修回日期】 2022-03-29