

DOI:10.13350/j.cjpb.220408

• 论著 •

# 内蒙古东部部分奶牛场奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及毒力基因检测<sup>\*</sup>

蒙小刚<sup>1</sup>, 刘嘎<sup>1</sup>, 吕香玉<sup>1</sup>, 郭双<sup>1</sup>, 麦拉苏<sup>1</sup>, 李偲<sup>1</sup>, 王永强<sup>1</sup>, 刘锴<sup>1,2\*</sup>, 温树波<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心;  
3. 内蒙古民族大学人畜共患病研究院)

**【摘要】** 目的 检测内蒙古东部奶牛场奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌感染情况,并鉴定其毒力基因携带情况。方法 采集 61 份临床型乳房炎奶牛的牛奶样品进行金黄色葡萄球菌的分离鉴定。利用 PCR 方法检测分离株金黄色葡萄球菌的 *nuc*、*clfA*、*fnbA*、*fnbB*、*tsst-1*、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*seg*、*see*、*seh*、*sei* 和 *sej* 14 种毒力基因,并对其中 1 株进行 16S rRNA 基因序列分析、生化检测、药敏试验以及动物致病性试验。结果 成功分离到 20 株金黄色葡萄球菌。从分离菌中共检测到 11 种毒力基因,其中 *nuc*、*clfA*、*fnbB*、*sea*、*sed*、*sei* 6 种毒力基因检出率均超过 50%。随机挑选 1 株分离菌,将其命名为 TLXG01。16S rRNA 基因序列分析显示,分离菌与已报道的 MF511713.1 H2 处于同一分支且相似度均高于 99%。药敏试验显示,该分离菌对 14 种常用抗生素敏感,对多粘菌素和链霉素耐药。动物致病性试验显示,该分离株对小鼠具有较强的致病性。结论 内蒙古东部 5 个奶牛场乳房炎奶牛均有金黄色葡萄球菌感染,该病原菌携带毒力基因的数量和种类不同,且存在多种毒力基因组合,可为当地奶牛场奶牛金黄色葡萄球菌性乳房炎的防治提供参考。

**【关键词】** 奶牛乳房炎;金黄色葡萄球菌;分离鉴定;毒力基因

**【中图分类号】** R378.11

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)04-0415-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Apr;17(4):415-419,424.]

## Isolation, identification and virulence gene detection of *Staphylococcus aureus* from dairy cow with mastitis in eastern Inner Mongolia

MENG Xiao-gang<sup>1</sup>, LIU Ga<sup>1</sup>, LV Xiang-yu<sup>1</sup>, GUO Shuang<sup>1</sup>, MAI La-su<sup>1</sup>, LI Cai<sup>1</sup>, WANG Yong-qiang<sup>1</sup>, LIU Kai<sup>1,2</sup>, WEN Shu-bo<sup>1,3</sup> (1. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 2. Beef Cattle Disease Prevention and Treatment Engineering Center of Inner Mongolia Autonomous Region; 3. Brucellosis Prevention and Treatment Engineering Center of Inner Mongolia Autonomous Region) \*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the infection status and prevalence of the virulence genes of *S. aureus* in dairy cows from large-scale dairy farms in the eastern area of Inner Mongolia. **Methods** In this study, 61 milk samples of clinical mastitis in dairy cows were collected from dairy farms in the eastern area of Inner Mongolia. In total, fourteen virulence genes, including *nuc*, *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *tsst-1*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *see*, *seh*, *sei*, and *sej* were detected by PCR. The 16S rRNA gene sequence analysis, biochemical detection, drug sensitivity test and animal pathogenicity test were performed on one *S. aureus* strain. In addition, 16s rRNA gene of the isolate was identified by gene sequence analysis. **Results** In total, twenty strains of *S. aureus* were successively isolated, from which, eleven virulence genes were detected positive, with positive rates over 50% for *nuc*, *clfA*, *fnbB*, *sea*, *sed* and *sei* genes. Among them, the positive rate of *fnbB* was the highest, up to 90%, followed by *sei* gene with a positive rate of 65%, which suggested that the most prevalent serotype of *S. aureus* was type SEI One isolate was randomly selected and named TLXG01. The 16S rRNA gene sequence analysis suggested that the isolate was clustered in the same branch with MF511713.1 H2, with a similarity higher than 99%. Additionally, the results of drug sensitivity test showed that the isolate was highly sensitive to 14 commonly used antibiotics and resistant to polymyxin and streptomycin. Pathogenicity analysis showed all mice inoculated with the isolate at a dose of  $8 \times 10^8$  CFU/mL died within 12 h, indicating that TLXG01 was highly pathogenic to mice. **Conclusion** The five dairy farms in the eastern of Inner Mongolia were all infected by *S. aureus*, carrying virulence genes in different spe-

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31460662);内蒙古自治区科技重大专项(No. 2019ZD006);内蒙古民族大学博士基金启动项目(No. BS583, BS584)。

\*\* **【通讯作者】** 刘 锴, E-mail: liukai721026@163.com; 温树波, E-mail: wen0516@126.com

**【作者简介】** 蒙小刚(1995-),男,内蒙古呼和浩特人,硕士研究生,主要从事动物传染病学研究。E-mail: 1558462579@qq.com

cies and amount. Meanwhile, there are a variety of virulence gene combinations. This study provides certain theoretical guidance for the prevention and control of *S. aureus* mastitis in local dairy farms.

**【Key words】** dairy cow with mastitis; *Staphylococcus aureus*; isolation and identification; virulence gene

奶牛乳房炎是一种重要的奶牛疾病,主要是奶牛的乳腺组织受到病原微生物入侵而引起的一系列炎症反应<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起奶牛乳房炎的主要致病菌,该菌可产生溶血毒素、耐热核酸酶、血浆凝固酶和肠毒素等,可引起急、慢性和隐性乳房炎。由该菌引起的急、慢性乳房炎若得不到及时治疗常可发生感染区坏死或败血症,最终导致奶牛死亡,给奶业造成重大的经济损失<sup>[2]</sup>。目前,抗生素仍然是治疗金黄色葡萄球菌感染的主要药物<sup>[3]</sup>。由于抗生素的不合理使用,该菌出现了对多种抗生素同时耐药的现象。耐药菌株的流行给金黄色葡萄球菌感染的治疗带来了很大困难。本研究拟调查内蒙古自治区东部地区牛源金黄色葡萄球菌的感染情况及毒力基因携带情况,并对其中1株分离菌进行药敏试验、生化试验和致病性试验,以期了解当地牛源金黄色葡萄球菌流行情况及防治提供参考。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 主要试剂** 酵母浸膏、葡萄糖、氯化钠、蛋白胨、琼脂粉、Baird-Parker 平板均购自青岛海博生物技术有限责任公司;K-B 药敏纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司;16S rRNA 基因引物和 14 种毒力基因引物均由上海生工生物工程有限公司合成;2×Easy Taq PCR Mix 和 DNA DL2000 maker,凝胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒及核酸染料均为北京天根生化科技有限公司产品。

**1.2 主要仪器** 电泳仪购自 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统购自北京原平皓生物技术有限公司;PCR 仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司;BD Phoenix™ 100 全自动微生物鉴定仪和革兰阴性菌鉴定板为 BD 医疗器械有限公司产品。

### 2 方法

**2.1 样品采集** 随机采集位于内蒙古通辽市和兴安盟 5 个规模化奶牛场共计 61 份牛奶样品。采样前先用肥皂水对乳房进行清洗并用碘伏消毒,带一次性无菌乳胶手套挤压乳房,弃掉前 3 把奶,收集 30 mL 左右奶样,置于 50 mL 离心管中,低温快速运送到实验室进行检测。

**2.2 细菌的分离纯化** 将采集的乳样轻轻摇匀,无菌条件下滴适量样品于 Baird-Parker 琼脂平板上,用无菌涂布器均匀涂布,置于 37 °C 恒温培养箱中培养 16

~24 h 后观察菌落形态。挑取 Baird-Parker 琼脂板上黑色、周围有白色晕圈的菌落,接种于普通 LB 琼脂培养板上继续培养 12~24 h,待平板上长出单个边缘光滑的菌落后挑取单菌落涂片、革兰染色,在显微镜下观察细菌形态。

**2.3 血浆凝固酶试验** 采用金黄色葡萄球菌国标检验方法<sup>[4]</sup>。挑取分离的单个菌落,接种于 5 mL BHI 液体培养基中,37 °C、160 r/min 振荡培养 1~24 h,备用。取新制备的兔血浆 0.3 mL 与 0.2 mL 菌液充分混匀后置于 37 °C 培养箱培养,每隔 30 min 观察血浆凝固情况。如果 6 h 之内仍未出现凝固反应则培养过夜,第 2 d 观察是否凝固。

### 2.4 目的基因检测

**2.4.1 引物设计与合成** 根据文献<sup>[5]</sup>设计能够扩增金黄色葡萄球菌毒力基因 *nuc*、*clfA*、*fnbA*、*fnbB*、*tsst-1*、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei* 和 *sej* 引物共 14 对,由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如表 1。

**2.4.2 毒力基因及 16S rRNA 基因 PCR 扩增** 挑取方法 2.2 中的单个菌落,接种于 LB 液体培养基,37 °C、160 r/min 振荡培养过夜。用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA,PCR 扩增毒力基因。25 μL PCR 反应体系:2×Easy Taq PCR Super Mix 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,DNA 模板 2 μL,补充 ddH<sub>2</sub>O 水至 25 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V,时间 35 min)。用紫外胶成像系统观察目的条带并统计相关数据。随机挑选 1 株分离自内蒙古通辽市牛奶样品的病原菌,将其命名为 TLXG01,其 16S rRNA 扩增产物交由生工生物工程(北京)股份有限公司测序。

**2.5 TLXG01 菌株遗传进化分析** 将测序获得的 TLXG01 16S rRNA 序列进行 BLAST 比对分析,随机选取 14 条金黄色葡萄球菌 16S rRNA 基因序列作为参考序列,使用 MEGA 7.0 软件绘制系统进化树。

**2.6 TLXG01 菌株生化鉴定** 使用 BD Phoenix™ 100 全自动微生物鉴定仪对 TLXG01 进行生化特性鉴定。从培养过夜的琼脂平板上挑取单个菌落,将其接种到鉴定肉汤管中制成 0.5~0.6 麦氏单位的菌悬液。将制备的鉴定肉汤菌悬液倒入革兰阳性菌鉴定板中对应的鉴定孔中,封闭。检测板准备完毕后,扫描板条,

输入资料,将检测板放入仪器中反应。试验重复3次,反应结束后仪器自动读卡并打印最终结果。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

目的基因 Purpose gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	产物长度 (bp) Length product (bp)
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	
nuc	nuc-F	GCGATTGATGGTGATACGGGT	280
	nuc-R	AGCCAAGCCTTGACGAACTA-AAGC	
ClfA	clfA-F	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292
	clfA-R	CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG	
FnbA	fnbA-F	CATAAATTGGGAGCAGCATCA	128
	fnbA-R	ATCAGCAGCTGAATTTCCATT	
fnbB	fnbB-F	GTAACAGCTAATGGTGAATT- GATAGT	524
	FnbB-R	CGATAGTFCGATAGGAGTACTAT-GTTC	
tsst-1	tsst-1-F	GATTTTACCCTGTCCCTTAYC	514
	tsst-1-R	AATAACCACCGTTTTATCG	
sea	sea-F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	521
	sea-R	GTTCGTAGGAAGTATGAAA- GAGGT	
seb	seb-F	GAGGTAAATTTGATATTCG- CACTG	667
	seb-R	TGCAGGCATCATGTCATACCA CTTGATGTATGGAGGAATAA- CAA	
sec	sec-F	TGCAGGCATCATATCATACCA	284
	sed-F	GTGGTGAATAGATAGGACTGC	
sed	sed-R	ATATGAAGGTGCTCTGTGG	385
	seg-F	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	
seg	seg-R	CCAAGTGATTGCTATTGTCG	328
	seh-F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	
she	seh-R	GTCCAATGAGTAAGTA- ATCTCTAGG	359
	see-F	TACCAATTAAGTGTGGATAGAC	
see	see-R	CTCTTGCACCTTACCGC	171
	sei-F	CAACTCGAATTTTCAACAGG- TACC	
sei	sei-R	CAGGCAGTCCATCTCCTG	466
	sej-F	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG	
sej	sej-R	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142

2.7 TLXG01 菌株药物敏感性试验 采用 K-B 纸片扩散法。吸取 50 μL 方法 2.4 中培养过夜的 TLXG01 菌液于普通营养琼脂平板上,用一次性无菌涂布棒将其均匀涂布。无菌夹取药敏片轻轻贴附于培养基上,试验设立 3 个重复,37 °C 培养 18~24 h 后观察并测量抑菌圈直径。药敏试验用药物包括青霉素、红霉素、氧氟沙星、环丙沙星等 16 种抗生素。

2.8 TLXG01 菌株动物试验 将分离菌液用平板活菌计数法和湿重法相结合计数。将 20 只 4 周龄健康雌性 BALB/C 小鼠随机分为 4 组:阴性对照组及金葡萄球菌 8×10<sup>6</sup>、8×10<sup>7</sup>、8×10<sup>8</sup> CFU/mL 组,每组 5 只小鼠。阴性对照组小鼠腹腔注射 0.9% 生理盐水,0.5 ml/只。免疫注射后观察并记录小鼠的发病及死亡情况。

表2 菌株 TLXG01 的生化特性  
Table 2 Biochemical test results of strain TLXG01

生化试验 Biochemical test	结果 Result	生化试验 Biochemical test	结果 Result
精氨酸-精氨酸-AMC (ARARR)	-	D-塔格糖 (DTAG)	-
甘氨酸-脯氨酸-AMC (GLPRB)	-	D-海藻糖 (DTRE)	+
L-丙氨酸-AMC (LALT)	-	麦芽糖 (MAL)	+
L-精氨酸-AMC (LARGH)	-	麦芽丙糖 (MTT)	+
L-组氨酸-AMC (LHIST)	-	N-乙酰-葡萄糖 (NGU)	-
L-异亮氨酸-MAC (LISO)	-	尿素 (URE)	-
L-亮氨酸-MAC (LLEUH)	-	七叶酸 (MGP)	+
L-苯丙氨酸-MAC (A-LPHET)	-	多粘菌素 B (PXB)	+
L-脯氨酸-MAC (A-LPROB)	-	胸苷 (THY)	-
L-焦谷氨酸-MAC (A-LPYR)	-	4MU-AD-葡萄糖苷 (ADGLU)	-
L-色氨酸-MAC (A-LTRY)	-	4UM-BD-纤维二糖糖苷 (BDCEL)	-
蛋氨酸-MAC (META)	-	4UM-BD-半乳糖糖苷 (BDGAL)	-
3-甲基-戊二酸 (3MGA)	+	4UM-BD-葡萄糖苷酸 (BDGLC)	-
多粘菌素 (CLST)	+	PNP-BD-二葡萄糖苷 (BDGLU)	+
D-果糖 (DFRU)	+	4UM-磷酸盐 (PHOS)	+
D-葡萄糖酸 (DGUA)	+	4UM-海藻糖 (PHOT)	-
D-甘露醇 (DMNT)	+	丙氨酸-丙氨酸-PNA (ALALH)	-
亚氨基-乙酸 (IMN)	+	缬氨酸-丙氨酸-PNA (VAALA)	+
ALPH-酮戊二酸 (KGA)	+	PNP-磷酸盐 (PHOL)	-
4-甲基-己二酸 (MAA)	+	B-龙胆二糖 (R-BGEN)	+
蔗糖 (R-DSUC)	+	右旋糖 (R-DEX)	-

表3 TLXG01 菌株对 16 种抗菌药物的敏感性试验  
Table 3 Results of drug sensitivity test

药物名称 Drug name	药物浓度 Dosage (μg/disc)	抑菌环直径 Inhibition zone diameter (mm)	药敏试验结果 Result
氯霉素	30	12	I
红霉素	15	20	S
头孢噻唑	30	18	S
头孢西丁	30	18	S
四环素	30	12	I
多粘菌素	30	5	R
氧氟沙星	10	18	S
链霉素	10	4	R
卡那霉素	30	17	S
头孢噻肟	30	18	S
环丙沙星	10	20	S
克拉维酸	3	20	S
多西环素	30	18	S
万古霉素	30	18	S
新霉素	30	16	S
青霉素	10U	12	I

注:R:耐药; I:中等敏感; S:敏感。  
Notes:R:Resistance; I: Moderate; S: Sensitivity.

## 结果

### 1 菌株分离鉴定

将 61 份无菌采集的乳样接种于 Baird-Parker 琼脂平板上,37 °C 培养 18 h,有 20 份乳样在该平板上生长出圆形凸起、边缘整齐、呈黑色的菌落,且外层有一透明圈(图 1A);涂片革兰染色镜检为革兰阳性球菌(图 1B)。

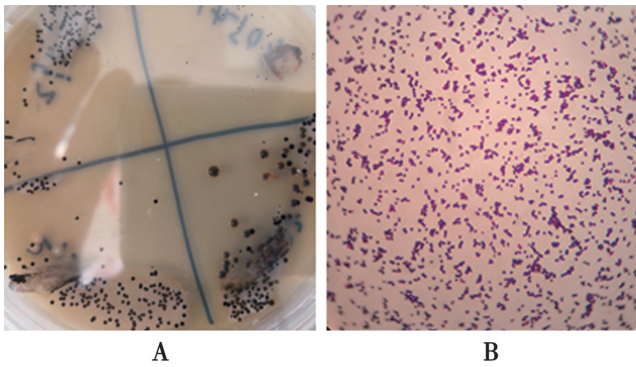


图 1 分离菌株在 Baird-Parker 琼脂平板上的菌落形态(A) 及革兰染色形态(B)

Fig. 1 Colony morphology(A) and Gram-stained bacterial morphology(B) of the isolates on Baird-Parker AGAR plate

## 2 分离菌株的血浆凝固酶试验

20 株分离菌培养 4 h 后有 15 株血浆凝固酶试验阳性,其余 5 株培养过夜后血浆凝固酶试验阳性。确定 20 株分离菌为金黄色葡萄球菌。

## 3 分离菌株毒力基因携带情况

对 20 株分离菌进行毒力基因 PCR 检测,结果如图 2。金黄色葡萄球菌的 14 种毒力基因有 11 种被检出,其中 *nuc*、*clfA*、*fnbB*、*sea*、*sed*、*sei* 6 种毒力基因检出率均超过 50%。

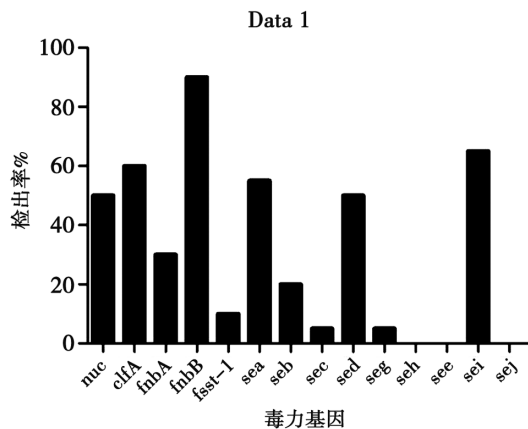
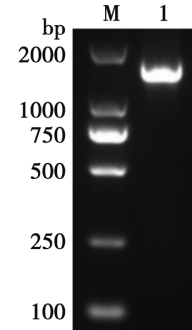


图 2 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌毒力基因检出情况  
Fig. 2 Detection of *S. aureus* virulence genes in dairy cows with mastitis

## 4 TLXG01 菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增及遗传进化分析

PCR 扩增分离菌株 TLXG01 的 16S rRNA 基因,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,目的基因片段在 1 000~2 000 bp 之间(图 3),测序结果为 1 486 bp。将该菌株 16S rRNA 基因测序结果进行 BLAST 比对分析,结果显示该菌株与金黄色葡萄球菌参考基因序列的相似性达 99% 以上。选取 15 条同源性相近的金黄色葡萄球菌 16S rRNA 核酸序列,使用

MEGA6.0 软件构建系统发育树(图 4),显示 TLXG01 与人痰液中检测到的金黄色葡萄球菌 MF511713.1 H2 处于同一个小分支,亲缘关系最近。两者同源性高达 99.9%。进一步证明分离株 TLXG01 为金黄色葡萄球菌。



M DNA 标志物 1 TLXG01 菌株 16S rRNA 基因 PCR 产物  
图 3 TLXG01 菌株 16S rRNA 基因 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of 16S R RNA gene of TLXG01 strain

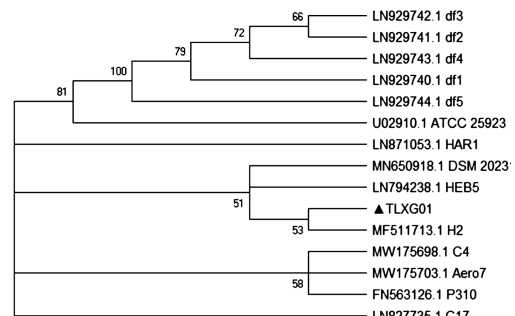
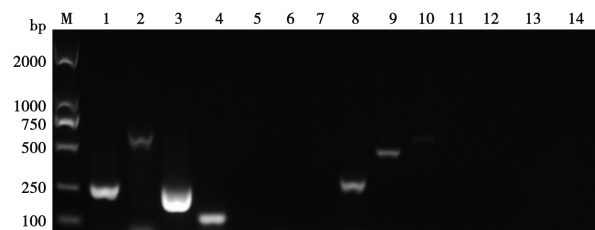


图 4 分离菌株 TLXG01 16S rRNA 基因系统进化树  
Fig. 4 The strain TLXG01 16S rRNA gene phylogenetic tree



M DL 2000 maker 1~8 分别为分离菌毒力基因 *nuc*、*seb*、*sec*、*fnbA*、*sej*、*sea*、*sed*、*clfA*、*tsst-1*、*fnbB*、*seg*、*she*、*see*、*sei*

图 4 TLXG01 菌株 14 种毒力基因的 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析  
M DL 2000 maker 1~8 Toxin genes of the isolated strains *nuc*、*seb*、*sec*、*fnbA*、*sej*、*sea*、*sed*、*clfA*、*tsst-1*、*fnbB*、*seg*、*she*、*see*、*sei*

Fig. 4 Analysis of 14 virulence genes of TLXG01 strain by PCR product agarose gel electrophoresis

## 5 TLXG01 菌株毒力基因携带情况

以 TLXG01 菌株基因组为模板,用 14 种毒力基因引物进行 PCR 扩增,7 种毒力基因与目的片段大小符合,*nuc* 基因(280 bp)、*seb* 基因(667 bp)、*see* 基因



(171 bp) *fnbA* 基因(128)、*clfA* 基因(292 bp)、*tsst-1* 基因(514 bp)、*fnbB* 基因(524 bp)(图 3)。表明该菌株携带上述 7 种毒力基因。

## 6 TLXG01 菌株生化特性

利用 BD Phoenix™ 100 全自动微生物鉴定仪对 TLXG01 菌株进行生化鉴定,结果如表 3。TLXG01 可分解果糖、葡萄糖酸、蔗糖、麦芽糖等,符合金黄色葡萄球菌的生物学特性。该菌能分解甘露醇,符合致病性菌株的生物学特性。此外,该分离株还能分解多粘菌素、海藻糖、七叶酸等,不能分解精氨酸,不能水解尿素。

## 7 TLXG01 菌株的药物敏感性

药敏试验结果显示,TLXG01 菌株对红霉素、氧氟沙星、头孢噻唑、万古霉素等 11 种药物敏感,对氯霉素、四环素、青霉素中度敏感,对多粘菌素、链霉素耐药(表 3)。

## 8 TLXG01 菌株的致病性

动物实验期间对照组小鼠未见异常。TLXG01  $8 \times 10^8$  CFU/mL 组小鼠 12 h 内全部死亡; $8 \times 10^7$  CFU/mL 组小鼠精神沉郁,体温升高,5d 内恢复正常; $8 \times 10^6$  CFU/mL 浓度组无明显异常。

## 讨 论

奶牛养殖业在我国畜牧业中占有重要地位,每年由鲜牛奶带来的经济效益近 400 亿元<sup>[6]</sup>。奶牛乳房炎是奶牛养殖过程中最为常见、经济损失最大的一种疾病。奶牛乳房炎不仅严重影响牛奶品质,还会影响奶牛的繁殖、生长、发育以及牛奶产量。据报道,奶牛乳房炎发病率为 20%~60%<sup>[7]</sup>,每年因乳房炎淘汰的奶牛占总淘汰牛的 30%以上,我国奶牛乳房炎发病率约为 33.4%,因乳房炎造成的经济损失在 1 200~3 600 元/头,给奶牛养殖业造成了巨大的经济损失,严重制约着奶牛养殖业的发展<sup>[8]</sup>。引发奶牛乳房炎的主要因素是病原微生物感染,金黄色葡萄球菌是最常见的病因,其感染通常难以治愈并易复发<sup>[8]</sup>。葡萄球菌的致病力强弱主要取决于其产生的毒素和侵袭酶,目前已知的毒力因子主要包括核酸酶(Nuclease, nuc)、粘附因子(Clumping factor A, *clfA*)、纤维结合蛋白(Fibronectin-binding protein, *Fnb*)、毒性休克综合征毒素-1(Toxic shock syndrome toxin, *tsst-1*)、肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SE)、表皮剥落毒素(Exfoliative toxin, Et)和杀白细胞素(Panton-valentine leucocidin, *pvl*)等<sup>[9]</sup>。

nuc 能耐受高温,广泛应用于食物中金黄色葡萄球菌污染鉴定,该酶在加热后的食物中存在,能够与肠

毒素在相同条件下合成。*clf* 是一种粘附素,金黄色葡萄球菌表面 *clf* 粘附哺乳动物上皮细胞外基质能力的大小直接影响其致病力。*clf* 的表达有利于该菌的侵入、定植及扩散。*clfA* 是目前已知的金黄色葡萄球菌黏附于宿主细胞的最重要的粘附因子之一。*Fnb* 位于金黄色球菌表面,可使细菌黏附于宿主细胞表面,促进细菌入侵<sup>[10]</sup>。*tsst-1* 最早被命名为热源性外毒素或肠毒素 F,金黄色葡萄球菌 *tsst-1* 的检出率为 20%左右。SE 是一类具有相似结构和毒力但抗原性不同的胞外蛋白质,目前发现 24 种不同的 SE 或类肠毒素(SE-like toxins, SEIs),该毒素具有很高的稳定性,耐弱酸碱并耐热<sup>[11]</sup>。Et 是金黄色葡萄球菌分泌的一种外毒素,在金黄色葡萄球菌中的检出率为 5%左右,该毒素可引起金黄色葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征(staphylococcal scalded-skin syndrome, SSSS)<sup>[12]</sup>。*pvl* 可破坏哺乳动物的中性粒细胞,并可诱导释放一些细胞因子,可有效抵抗巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬作用<sup>[13]</sup>。

本研究对分离自内蒙古东部 5 个规模化奶牛场 20 株金黄色葡萄球菌的 14 种毒力基因进行了检测,共检出 11 种毒力基因,其中 *fnbB* 检出率最高,达 90%。其次为 *sei* 基因,检出率为 65%。此外,*clfA*、*sea* 和 *nuc* 的检出率也较高,均超过 50%。*sec* 和 *seg* 的检出率最低,为 5%。表明该地区当前流行的肠毒素血清型主要为 *sei* 型。

对随机挑选的分离株 TLXG01 16S rRNA 基因序列遗传进化分析发现,该菌株与一株分离自人痰液中的金黄色葡萄球菌位于同一分支,亲缘关系较近,同源性高达 99.9%。推测是由于人饮用该菌污染的牛奶而引发感染,提醒人们应重视奶牛金黄色葡萄球菌对公共卫生安全的影响。毒力基因检测显示,TLXG01 菌株携带 *nuc*、*seb*、*sec*、*fnbA*、*clfA*、*tsst-1*、*fnbB* 7 种毒力基因,与已报道的辽宁地区奶牛乳房炎分离的金黄色葡萄球菌菌株毒力基因携带情况<sup>[14]</sup>相似。生化试验结果显示,TLXG01 符合金黄色葡萄球菌的生物学特性,可分解果糖、葡萄糖酸、蔗糖、麦芽糖等。能分解甘露醇,符合致病性菌株的生物学特性。此外,该分离株还能分解多粘菌素、海藻糖、七叶酸等,不能分解精氨酸,不能水解尿素。该分离株与大多数金黄色葡萄球菌不同<sup>[15]</sup>,对多种常用抗生素敏感,对链霉素和多粘菌素耐药青霉素有一定的耐药性,且对小鼠有较强的致死性。本研究可为了解内蒙古东部地区金黄色葡萄球菌感染情况及其防治提供参考信息。

[7] Moritz ED, Winton CS, Tonnetti L, et al. Screening for *Babesia microti* in the U. S. blood supply [J]. N Engl J Med, 2016, 375 (23): 2236-2245.

[8] Tonnetti L, Townsend RL, Deisting BM, et al. The impact of *Babesia microti* blood donation screening [J]. Transfusion, 2019, 59(2): 593-600.

[9] Chen Z, Li H, Gao X, et al. Human babesiosis in China: a systematic review [J]. Parasitol Res, 2019, 118(4): 1103-1112.

[10] 姚立农, 阮卫, 曾长佑, 等. 1 例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(2): 118-121.

[11] 欧阳榕, 陈朱云, 林耀莹, 等. 福建省 1 例人巴贝虫病的诊断与鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 492-494.

[12] Chen Y, Yan D, Zhang YC. Transfusion-associated babesiosis in China: A case report [J]. Transfus Apher Sci, 2020, 59(6): 102902.

[13] Jiang JF, Zheng YC, Jiang RR, et al. Epidemiological, clinical, and laboratory characteristics of 48 cases of "*Babesia venatorum*" infection in China: a descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(2): 196-203.

[14] 乔岩, 彭恒, 朱淮民, 等. 广西 1 例人田鼠巴贝虫感染巢式 PCR 鉴定及其同事感染调查[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2015, 42(3): 152-155.

[15] Zhou X, Li SG, Chen SB, et al. Co-infections with *Babesia microti* and Plasmodium parasites along the China-Myanmar border [J]. Infect Dis Poverty, 2013, 2(1): 24.

[16] 李素华, 赵玉玲, 高丽君, 等. 河南省信阳市发热伴血小板减少患者中巴贝虫感染的分子流行特征分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(1): 66-69.

[17] 王华素, 彭恒, 朱淮民, 等. 广西某血站献血员巴贝虫感染情况调查[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(3): 283-287.

[18] 杨亚闪, 郭艳丽, 李洪军, 等. 巴西虫实时荧光 PCR 检测方法初步建立及牡丹江市无偿献血者中巴西虫流行情况调查[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(3): 271-276.

[19] 林红, 姬艺洪, 陈晓莉, 等. 江苏地区无偿献血人群巴贝虫感染调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(5): 516-518, 528.

[20] Zhou X, Xia S, Huang JL, et al. Human babesiosis, an emerging tick-borne disease in the People's Republic of China [J]. Parasit Vectors, 2014(7): 509.

[21] Ord RL, Lobo CA. Human babesiosis: Pathogens, prevalence, diagnosis and treatment [J]. Curr Clin Microbiol Rep, 2015, 2(4): 173-181.

[22] Teal AE, Habura A, Ennis J, et al. A new real-time PCR assay for improved detection of the parasite *Babesia microti*[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 903-908.

[23] Tonnetti L, Young C, Kessler DA, et al. Transcription-mediated amplification blood donation screening for *Babesia*[J]. Transfusion, 2020, 60(2): 317-325.

[24] 张逸龙, 潘卫庆. 新型等温扩增技术推动寄生虫病现场快速检测能力提升[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(4): 331-334.

[25] 吴芬, 蔡玉春, 秦志强, 等. 田鼠巴贝虫感染 FTA-环介导等温扩增检测技术的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(5): 435-441.

[26] Nie Z, Zhao Y, Shu X, et al. Recombinase polymerase amplification with lateral flow strip for detecting *Babesia microti* infections[J]. Parasitol Int, 2021(83): 102351.

【收稿日期】 2021-12-11 【修回日期】 2022-02-01

(上接 419 页)

【参考文献】

[1] De Vries SPW, Hadjirin NF, Lay EM, et al. *Streptococcus bovis mastitidis* sp. nov., isolated from a dairy cow with mastitis [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2018, 68(1): 21-27.

[2] Sharun K, Jambagi K, Dhama K, et al. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review [J]. Vet Q, 2021, 41(1): 107-136.

[3] Monistero V, Barberio A, Cremonesi P, et al. Genotyping and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus uberis* isolated from a clinical bovine mastitis outbreak in a dairy farm [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(6): 644.

[4] GB 4789. 10-2016. 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.

[5] 刘康军, 曹菲菲, 孙莹慧, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(2): 133-137.

[6] 霍晓娜. 我国低温鲜奶市场发展现状及趋势[J]. 中国乳业, 2020 (10): 22-25.

[7] Akers RM, Nickerson SC. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011, 16(4): 275-289.

[8] Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011, 16(4): 291-304.

[9] Gillespie BE, Headrick SI, Boonyayatra S, et al. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds [J]. Vet Microbiol, 2009, 134(1-2): 65-72.

[10] 赵艳, 张爱荣, 郝永清. 金黄色葡萄球菌 FnBPA D 基因片段的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(5): 361-365.

[11] 王铜, 陶晓霞, 孟凡亮, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法新进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1475-1480.

[12] Magana-Lizarraga JA, Parra-Unda JR, Ahumada-Santos YP, et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* L401, a mecA-negative community-associated methicillin-resistant strain isolated from a healthy carrier [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019 (17): 260-262.

[13] 刘文宇, 祝瑶, 王长珍, 等. 金黄色葡萄球菌杀白细胞素基因敲除菌株的构建及生长特性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42 (11): 1104-1108.

[14] 杨小庆. 辽宁地区奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌分离株耐药性研究及毒力基因检测[D]. 沈阳农业大学, 2019.

[15] Kareiviene V, Pavilonis A, Sinkute G, et al. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics and spread of phage types [J]. Medicina (Kaunas, Lithuania), 2006, 42(4): 322-329.

【收稿日期】 2021-12-26 【修回日期】 2022-02-11