

# 乳房炎奶牛金黄色葡萄球菌毒素基因的检测及 PFGE 分型研究

王新<sup>1</sup>, 韦艺媛<sup>2</sup>, 张静<sup>3</sup>, 周婷<sup>3</sup>, 梁珍娟<sup>1</sup>, 杨保伟<sup>1</sup>, 席美丽<sup>1</sup>,  
夏效东<sup>1</sup>, 孟江洪<sup>1\*</sup>, 俞英<sup>2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学食品学院, 杨凌 712100, 2. 中国农业大学动物科技学院,  
北京 100193; 3. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 作者针对临床及亚临床乳房炎奶牛乳汁中金黄色葡萄球菌分离株的毒素基因进行检测和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 基因分型, 比较 2 种类型乳房炎金黄色葡萄球菌分离株的差异。无菌法采集奶样, 采用国际标准方法从中分离金黄色葡萄球菌, 用多重 PCR 方法扩增 *nuc* 基因和 *mecA* 基因以确证金黄色葡萄球菌 (SA) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)。进一步用 PCR 方法检测 SA 的各种毒素基因 (*SEs*, *ETs*, *TSST-1* 和 *PVL* 基因等)。利用限制性内切酶 *Sma* I 对 SA 基因组 DNA 进行酶切和 PFGE 分析, 最后利用 BioNumerics 软件进行聚类分析。结果: 19.3% (23/119) 的临床乳房炎奶样和 14.8% (26/176) 的亚临床乳房炎奶样确定为金黄色葡萄球菌阳性样品, 分别从中分离鉴定出 43 株和 26 株金黄色葡萄球菌, 其中临床乳房炎分离株中有 5 株为 *mecA* 基因阳性。临床乳房炎奶样中检测到 SA 的 *SEA*, *SEB*, *SED*, *SEJ* 和 *PVL* 毒素基因, 检出率分别为 3.8% (1 株)、11.5% (3 株)、19.2% (5 株)、7.7% (2 株) 和 31.2% (10 株); 亚临床乳房炎奶牛乳样中仅检测到 SA 的 *SEA* 和 *PVL* 毒力基因, 检出率分别为 7.0% (3 株) 和 84.1% (37 株)。表明临床与亚临床乳房炎奶牛乳汁中 SA 菌株携带的毒素基因不一样, *SEs* 可能是临床乳房炎菌株的重要致病基因, *PVL* 可能是亚临床乳房炎菌株的重要致病基因。69 株 SA 使用 *Sma* I 酶切分型后, 可分为 7 个大簇、50 个基因型, 来源相同的 SA 分型后大部分位于同一簇内。临床乳房炎奶牛乳汁中检测到 MRSA 菌株, *PVL* 基因在亚临床乳房炎中的检出率为临床乳房炎的 2.7 倍。PFGE 方法能较好的区分临床乳房炎和亚临床乳房炎的 SA 分离菌株。

**关键词:** 奶牛; 金黄色葡萄球菌; *mecA* 基因; 毒素基因; PFGE 分型

中图分类号: R378.22

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-0974-07

## Virulence Genes and PFGE Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cows with Subclinical and Clinical Mastitis

WANG Xin<sup>1</sup>, WEI Yi-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>3</sup>, ZHOU Ting<sup>3</sup>, LIANG Zhen-juan<sup>1</sup>,  
YANG Bao-wei<sup>1</sup>, XI Mei-li<sup>1</sup>, XIA Xiao-dong, MENG Jiang-hong<sup>1\*</sup>, YU Ying<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100,  
China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University,  
Beijing 100193, China; 3. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University,  
Yangling 712100, China)

**Abstract:** The aim of the present study was to investigate toxin genes properties and PFGE profiles of *S. aureus* strains (SA) isolated from cows with subclinical mastitis and clinical mastitis.

收稿日期: 2010-12-08

基金项目: 长江学者讲座教授奖励计划项目 (Z111020001); 博士科研启动费 (01140407); 教育部基础科研业务项目 (2011JS006); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2009ZX08009-146B); 北京市农业局试验示范项目 (20100222); “948”项目 (2010-C14)

作者简介: 王新 (1973-), 男, 邳崮市人, 讲师, 博士, 主要从事食源性病原及分子生物学和食品安全研究, E-mail: xinwang7516@yahoo.com.cn; 韦艺媛 (1988-), 女, 遵义人, 硕士研究生, 主要从事动物分子抗病育种及病原菌分型鉴定研究, E-mail: weiyiyuan2007@yahoo.cn, 二人共同为第一作者

\* 通讯作者: 孟江洪, E-mail: jmeng@mail.umd.edu; 俞英, E-mail: yuying@cau.edu.cn

For this purpose, milk samples were sterilely collected from Chinese Holstein cows with subclinical and clinical mastitis. SA strains or methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains were confirmed by multiplex PCR based on *nuc* and *mecA* genes. SA isolates were recovered and characterized by kinds of toxin genes of SA (*SEs*, *ETs*, *TSST-1* and *PVL* genes) with PCR and PFGE assays. Results were as follows: 69 *S. aureus* isolates were recovered from 19.3% subclinical mastitis samples (43 isolates) and 14.8% clinical mastitis samples (26 isolates), in which 5 isolates from clinical mastitis were *mecA*-positive *S. aureus*. From clinical mastitis isolates, *SEA*, *SEB*, *SED*, *SEJ* and *PVL* genes were detected with the rate of 3.8% (1 isolate), 11.5% (3 isolates), 19.2% (5 isolates), 7.7% (2 isolates) and 31.2% (10 isolates), respectively, whereas *SEA* and *PVL* were detected from subclinical mastitis isolates with the rates of 7.0% (3 isolates) and 84.1% (37 isolates), respectively. The results implied that *SEs* may be important pathogenic genes of *S. aureus* strains in the cows with clinical mastitis, while *PVL* may be key pathogenic gene for the cows with subclinical mastitis. Fifty pulsotypes and seven PFGE lineage groups from A to G were obtained by PFGE, and *S. aureus* strains isolated from the same source were classified into the same cluster. MRSA strains were only isolated from cows with clinical mastitis. The detection rates of *PVL* genes in cows with subclinical mastitis were 2.7 times higher than that with clinical mastitis. The distribution of virulence genes in *S. aureus* isolates was distinctly different between the cows with subclinical mastitis and clinical mastitis via PFGE assays.

**Key words:** cows; *S. aureus*; *mecA*; virulence genes; PFGE

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是引起奶牛乳房炎最主要的病原微生物之一,常引起奶牛发生临床和亚临床(隐性)乳房炎。目前主要采用抗生素预防和治疗由 SA 引起的奶牛乳房炎,但是 SA 中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有较强耐药性,常规方法难以治愈,一旦发现 MRSA 感染牛能将之淘汰,造成奶业巨大损失<sup>[1]</sup>。

金黄色葡萄球菌能产生多种毒素,主要包括肠毒素(enterotoxins, SEs),休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1),剥落毒素(exfoliative toxins, ETs)和杀白细胞素(panton-valentine leukocidin, PVL)<sup>[2-5]</sup>,其中肠毒素是引起食物中毒的主要因子,除了 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 5 种传统的肠毒素外,近几年还发现了 SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、SEIP、SEIQ、SEIR、SEIU、SEIU2 和 SEIV 等新型肠毒素<sup>[5]</sup>。由于缺乏简单特异的检测方法,新发现的肠毒素与食物中毒和牛感染之间的关系尚未明确。携带杀白细胞素(PVL)基因的金黄色葡萄球菌可导致皮肤、软组织感染和坏死性肺炎。

近年来,各种分型方法已应用到细菌的分型研究中,其中包括随机扩增多态性分析(RAPD)、扩

增片段长度多态性分析(RFLP)、核糖体基因分型(Ribotyping)、多位点重复序列分型(MLVA)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)等技术用于细菌分子分型。其中 PFGE 被认为是细菌基因分型的“黄金标准”,具有较好的分型性、分辨力和重复性,能较好地反映细菌类型与流行病学的相关性,是理想的细菌分型方法。然而,该技术在乳房炎奶牛金黄色葡萄球菌分型中的应用报道还很少<sup>[6]</sup>。

本研究采用 PCR 方法和 PFGE 分型方法对陕西省内奶牛场亚临床和临床乳房炎病例分离到的金黄色葡萄球菌菌株进行毒素基因检测和 PFGE 分型,探讨 *S. aureus* 在该地区奶牛场的分子生物学流行规律,为奶牛乳房炎发病机制及乳房炎抗病机理研究以及奶制品安全风险评估提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 培养基和主要试剂

Baird-Parker 琼脂(BP),Luria-Bertani(LB) 营养琼脂和胰酶大豆肉汤/琼脂(Trypticase Soy broth/Agar, TSB/TSA),购自北京陆桥技术有限责任公司;PFGE 专用琼脂糖(SeaKem Gold Agarose)购自美国 Cambrex 公司,十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)、乙二醇

四乙酸(EDTA)等购自 Sigma 公司,硼酸和氯化钠购自西安化学试剂厂,蛋白酶 K、限制性内切酶 *Xba* I、限制性内切酶 *Sma* I、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物 DL-2000 Marker 及 100 bp Marker,均购于大连宝生物公司。

### 1.2 样品及细菌分离

分别于 2008—2009 年采集陕西省内 10 个奶牛场的共 295 份奶样,其中包括亚临床乳房炎奶样 119 份和乳房炎奶样 176 份,依据 GB/T 4789.10-2008 方法增菌分离 *S. aureus*。根据菌落形态及二重 PCR 参照文献<sup>[7-8]</sup>检测 *nuc* 基因和 *mecA* 基因特征来判定金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。细菌鉴定质控菌为金黄色葡萄球菌 ATCC29213,布伦登卢普沙门氏菌(*Salmonella Braenderup*) H9812 为沙门氏菌 PFGE 分型用标准菌株,为中国药品生物制品检定所崔生辉博士惠赠。

### 1.3 基因组 DNA 的提取

挑取纯培养细菌,置入装有 500  $\mu$ L 双蒸水的

1.5 mL 离心管中,混匀。煮沸 20 min 后,12 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 5 min,取上清液,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 PCR 引物设计及 PCR 扩增条件

按照 Brakstad 等和 Zhang 等报道<sup>[7-8]</sup>执行 *nuc* 基因和 *mecA* 基因引物合成和扩增条件,进行二重 PCR 扩增确定金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。按照王琴等报道<sup>[9]</sup>执行 *PVL* 基因引物合成和扩增条件。按照 Peles 等报道<sup>[4]</sup>执行肠毒素基因(*SEA* 基因、*SEB* 基因、*SEC* 基因、*SED* 基因、*SEE* 基因、*SEG* 基因、*SEH* 基因、*SEI* 基因和 *SEJ* 基因)和休克综合征毒素-1(*TST-1* 基因)引物合成及扩增条件。按照 Noguchi 等报道<sup>[9]</sup>执行剥落毒素基因(*ETA* 基因、*ETB* 基因)引物合成和扩增条件。以上引物由大连宝生物公司合成,引物序列及扩增片段大小见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in PCR

基因 Gene	上游引物 Upper primer	下游引物 Lower primer	扩增片段/bp Fragment	文献 Literature
<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	AGCCAAGCCTTGACGA ACTAAAGC	279	[6]
<i>mecA</i>	GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	[7]
<i>PVL</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGG ACATGATCCA	GCATCAAGTGTATTGGA TAGCAAAAGC	433	[8]
<i>SEA</i>	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102	[4]
<i>SEB</i>	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	[4]
<i>SEC</i>	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	CACACTTTTAGAATCAACCG	451	[4]
<i>SED</i>	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	278	[4]
<i>SEE</i>	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	[4]
<i>SEG</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	CCAGATTCAAATGCAGAACC	704	[4]
<i>SEH</i>	CGAAAGCAGAAGATTTACACG	GACCTTACTTATTTTCGCTGTC	495	[4]
<i>SEI</i>	GACAACAAAAGTGTGCAAACTG	CCATATTCTTGCCTTTACCAG	630	[4]
<i>SEJ</i>	CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	[4]
<i>TSST-1</i>	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	TTTTTCAGTATTTGTAACGCC	326	[4]
<i>ETA</i>	ATATCAACGTGAGGGCTCTAGTAC	ATGCAGTCAGCTTCTTACTGCTA	1 155	[9]
<i>ETB</i>	CACACATTACGGATAATGCAAG	TCAACCGAATAGAGTGA ACTTATCT	604	[9]

## 1.5 PFGE 分型

1.5.1 细菌培养 将  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  15% 甘油保存的 *S. aureus* 接种于 LB 营养平板,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 16~18 h, 取适量菌落于 1.5 mL TE 中混匀, 使用 MicroScan 浊度计(Dade International, Inc.) 比浊计, 调整浊度值到 1.1~1.3, 取 300  $\mu\text{L}$  菌液于 1.5 mL eppendorf 管中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 10 min。

1.5.2 细菌裂解与酶切 取 4  $\mu\text{L}$  溶葡萄球菌素酶( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 溶于  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl) 加入到 300  $\mu\text{L}$  制备的菌液中, 再加到 300  $\mu\text{L}$  准备好的金胶中( $1\times\text{TE}$  制备 1.8% SeakemGold,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中预热), 轻轻混匀后取适量加入模具, 置室温或  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷却; 制备好的小胶块于 5 mL EC 裂解液( $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% Sodium lauroylsarcosine) 中裂解 4 h 以上, 用  $1\times\text{TE}$  洗 5 次, 每次 10~15 min, 均在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  摇床  $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  进行裂解与洗涤; 取约 2 mm 宽的小胶条于 3  $\mu\text{L}$  *Sma*I( $10\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  酶切 3 h; 将酶切小胶条包埋于 1% Seakem Gold 琼脂糖(用  $0.5\times\text{TBE}$  配制) 中进行电泳。Marker H9812 处理: 200  $\mu\text{L}$  菌液中加入 10  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K ( $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与等量 1% Seakem Gold: 1% SDS ( $1\times\text{TE}$  配制) 混合制备小胶条; 置于 5 mL CLB/蛋白酶 K (5 mL CLB/25  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K) 混合液中  $54$

$^{\circ}\text{C}$  摇床( $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 裂解 2 h; 洗胶 4 次后, *Xba* I  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  酶切 2 h。

1.5.3 电泳与图像分析 得到的限制性酶切 DNA 片段使用 Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳分型, 电泳缓冲液为  $0.5\times\text{TBE}$ , 电泳时间为 21 h, 电泳温度为  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脉冲时间为 5~40 s。凝胶使用溴化乙锭染色后成像, PFGE 成像结果使用 BioNumerics 软件的 UPGMA 和 Dice 参数进行聚类分析, 确定奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的基因型和同源关系。布伦登卢普沙门氏菌 H9812 为分型标准质控菌。

## 2 结果

### 2.1 SA 及 MRSA 分离鉴定

从陕西 10 个规模化牛场采集亚临床乳房炎奶样 119 份和临床乳房炎奶样 176 份, 通过选择培养基培养和 PCR 确定出亚临床乳房炎奶样 119 份中有 23 份(19.3%) 为金黄色葡萄球菌阳性样品。因有的 SA 阳性样本分离到 2 株细菌, 所以 23 个阳性 SA 样本共分离鉴定出 43 株金黄色葡萄球菌。临床乳房炎奶样 176 份当中有 26 份(14.8%) 为金黄色葡萄球菌阳性样品, 从中分离鉴定出 26 株金黄色葡萄球菌, 其中 5 株为 *mecA* 基因阳性, 结果如表 2 所示。

表 2 陕西地区临床及亚临床奶牛 SA 及 MRSA 检测结果

Table 2 Prevalence gene of *S. aureus* in subclinical mastitis and clinical mastitis

来源	样品数	<i>S. aureus</i> 阳性样品数	分离菌株数 <sup>a</sup>	<i>mecA</i> 基因阳性菌株数
Origin	Sample	<i>S. aureus</i> positive	Number of isolates	<i>mecA</i> positive
亚临床	119	23(19.3%)	43	0(0%)
临床	176	26(14.8%)	26	5(19.2%)
共计	295	43(14.6%)	69	5(7.2%)

<sup>a</sup>从每个阳性样品中分离出 1~2 个 *S. aureus* 菌株

There were 1-2 positive samples from each isolate

### 2.2 SA 毒素基因检测

本研究对 69 株金黄色葡萄球菌菌株进行毒素基因检测, 结果如表 3 所示, 检出肠毒素基因的有 12 株(17.4%), 其中临床乳房炎金黄色葡萄球菌肠毒素基因的阳性率为 34.6%, 亚临床乳房炎肠毒素基因的阳性率为 7.0%, 两者差异极显著( $P<0.01$ )。从临床乳房炎金黄色葡萄球菌中分别检测到肠毒素基因 *SEA* 1 株(3.8%), *SEB* 3 株(11.5%), *SED* 5

株(19.2%), *SEJ* 2 株(7.7%), 没有检测到携带肠毒素 *SEC*、*SEE*、*SEG*、*SEH* 和 *SEI* 基因的菌株。从亚临床乳房炎金黄色葡萄球菌中仅检测到肠毒素基因 *SEA* 3 株(7.0%)。临床和亚临床乳房炎金黄色葡萄球菌中检测到杀白细胞素基因(*PVL*) 分别为 10 株(38.5%) 和 37 株(86.0%), 亚临床株 *PVL* 检出率显著高于临床株( $P<0.01$ )。在临床和亚临床乳房炎金黄色葡萄球菌中均未检测到 *TSST-1* 基

因、*ETA* 基因和 *ETB* 基因。

表 3 *PVL*、*SEs*、*TSST-1* 和 *ETs* 基因在临床和亚临床乳房炎金黄色葡萄球菌中的分布

Table 3 Distribution of *PVL*, *SEs*, *TSST-1* and *ETs* genes of *S. aureus* from bovine subclinical mastitis and bovine clinical mastitis

来源(菌株数) Origin	<i>SEA</i> (%)	<i>SEB</i> (%)	<i>SED</i> (%)	<i>SEJ</i> (%)	共计 Total	<i>PVL</i>
亚临床(43 株)	3(7.0%)	0	0	0	3(7.0%)	37(86.0%)
临床(26 株)	1(3.8%)	3(11.5%)	5(19.2%)	2(7.7%)	9(34.6%)	10(38.5%)
共计(69 株)	4(5.8%)	3(4.3%)	5(7.2%)	2(2.9%)	12(17.4%)	47(68.1%)

*SEC*、*SEE*、*SEG*、*SEH*、*SEI*、*TSST-1*、*ETA* 和 *ETB* 基因在临床及亚临床乳房炎分离菌株中均未检测到

*SEC*, *SEE*, *SEG*, *SHE*, *SEI*, *TSST-1*, *ETA* and *ETB* genes were not detected in isolates from clinical and subclinical mastitis

### 2.3 PFGE 结果

PFGE 检测结果发现,69 株 *S. aureus* 都能被 *Sma* I 酶切开。采用 BioNumerics 分析软件对 PFGE 电泳图谱做聚类分析(图 1),结果显示 69 株 *S. aureus* 共分为 7 个大簇(A、B、C、D、E、F 和 G)和 50 个基因型。其中 A 大簇分为 6 个亚型(6 株),表型为临床株和亚临床株交叉流行。B 大簇又分为 5 个亚型(8 株),全为临床株流行株,其中有 4 株为 *mecA* 基因阳性菌株,说明 B 大簇是 *mecA* 基因阳性菌株的主要流行型。C 大簇可分为 2 个亚型(7 株),全为亚临床株流行株。D 大簇可分为 6 个亚型(7 株),全为临床株流行株。E 大簇又分为 21 个亚型(29 株),全为亚临床株流行株,E 大簇的菌株最多,占全部菌株的 42.0%。F 大簇又分为 3 个亚型(3 株),为临床株和亚临床株交叉流行,其中有 1 株为 *mecA* 基因阳性菌株。G 大簇又分为 7 个亚型(9 株),全为亚临床株流行株。

### 3 讨论

本文中所分离到的金黄色葡萄球菌(SA)来源于陕西省内的 10 个奶牛场,作者对菌株进行毒素基因和 PFGE 分型研究,分析奶牛场金黄色葡萄球菌的基本流行趋势、分布特点,对奶牛乳房炎病原的溯源以及抗乳房炎的机理研究具有重要意义。

本研究的临床和亚临床乳房炎奶牛金黄色葡萄球菌肠毒素基因的阳性比例分别为 34.6% 和 7.0%,这与国内马保臣等<sup>[11]</sup>报道的临床型乳房炎(27.42%)和亚临床乳房炎(1.41%)金黄色葡萄球菌肠毒素基因检测结果基本一致,但与国内夏胜超等<sup>[12]</sup>报道的临床型乳房炎(31.3%)和亚临床乳房

炎(47.1%)金黄色葡萄球菌肠毒素基因存在很大的差异。而国外报道肠毒素基因检出率在 4%~65%<sup>[13]</sup>,由此可见,不同国家、不同地区临床和亚临床乳房炎金黄色葡萄球菌肠毒素基因的检出率存在很大差异,说明奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌肠毒素基因的流行病学可能存在地域相关性。

本试验在亚临床奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌中仅检测到 *SEA* 基因(7%)和 *PVL* 基因(86.0%),未检测到其他毒素基因,这与 Boynukara 等<sup>[13]</sup>报道亚临床奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌主要产生 *SEA* 一致;而在临床奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌中检测到了 *SEA* 基因(3.8%)、*SEB* 基因(11.5%)、*SED* 基因(19.2%)、*SEJ* 基因(7.7%)和 *PVL* 基因(38.5%),未检测到其他毒素基因。通过方差分析发现,临床奶牛乳房炎菌株与亚临床奶牛乳房炎菌株肠毒素基因的携带率差异极显著( $P < 0.01$ )。此外,临床奶牛乳房炎菌株与亚临床奶牛乳房炎菌株的 *PVL* 基因携带率差异也极显著( $P < 0.01$ ),*PVL* 基因在亚临床乳房炎中的检出率为临床乳房炎的 2.7 倍。表明奶牛的临床乳房炎与亚临床乳房炎可能与所感染的金黄色葡萄球菌携带的不同类型的毒素基因有关。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)主要是获得了外源性 *mecA* 基因,该基因编码青霉素结合蛋白 2a,造成对  $\beta$ -酰胺类药物的耐药性。*mecA* 基因位于 SA 染色体基因盒(Staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*)内,该元件除携带 *mecA* 基因外,还携带有其他抗生素耐药基因,这是造成 MRSA 多重耐药的重要分子基础<sup>[7]</sup>。本研究对 *mecA*

基因的检测结果发现,5 株 *mecA* 基因阳性金黄色葡萄球菌均来自临床乳房炎奶牛,表明该地区牛场

存在 MRSA 菌株,因此必须加强对奶牛乳房炎 MRSA 菌株的监测和预防。

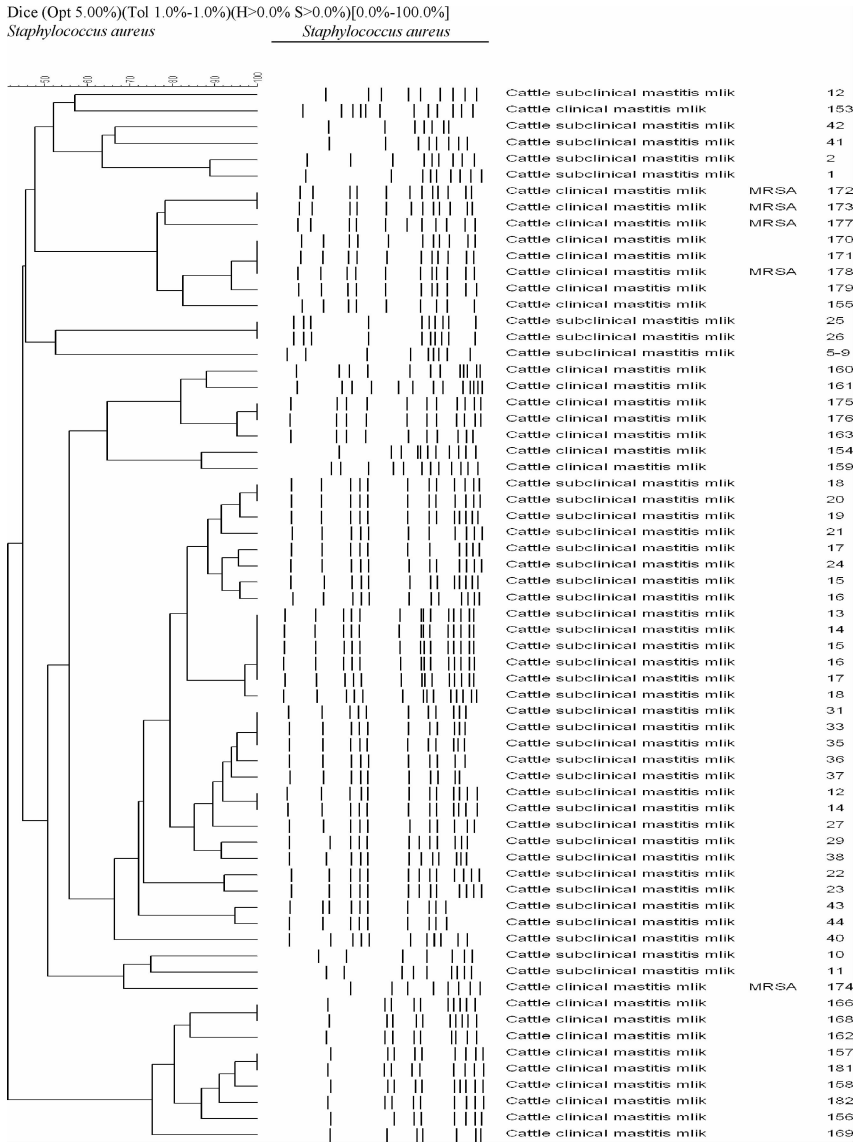


图 1 69 株金黄色葡萄球菌 *Sma* I 酶切脉冲场凝胶电泳分型聚类图

Fig. 1 Dendrogram of PFGE patterns showing the relatedness of 69 *S. aureus* strains

从菌株的来源(临床与亚临床)及 PFGE 聚类图的关系来看(图 1),69 株金黄色葡萄球菌使用 *Sma* I 酶切分型后,得到 7 个大簇,50 个基因型,其中 A 型和 F 型为临床和亚临床菌株交叉流行;B 型-D 型和 G 型全为临床流行株,其中 B 型中有 4 株 *mecA* 基因阳性菌株;E 型全为亚临床菌株,表明来源相同的金黄色葡萄球菌分型后基本位于同一大簇内,说明本研究中临床与亚临床流行的菌株型存在明显差异。另外,在临床菌株中分离出的 *mecA* 基

因阳性金黄色葡萄球菌几乎全部(4/5)在同一 PFGE 亚型,说明 *mecA* 基因阳性菌株可能来源于相同的克隆株。在国外奶牛中还发现了不能被 *sma* I 酶切的菌株型<sup>[14]</sup>,该株型在人与动物之间传播,而在本研究中并未发现该株型的流行,但为避免该菌株型通过进口奶牛遗传资源传到我国,有必要加强该细菌型的检疫。

## 参考文献:

- [1] FRANCIS J S, DOHERTY M C, LOPATIN U, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(1): 100-107.
- [2] MORONEY S M, HELLER L C, ARBUCKLE J, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 1019-1021.
- [3] DINGES M M, ORWIN P M, SCHLIEVERT P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(1): 16-34.
- [4] PELES F, WAGNER M, VARGA L, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 118(2): 186-193.
- [5] 李建平,周海健,袁林,等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 中国预防兽医学报. 2009, 31(9): 684-687.
- [6] BRAKSTAD O G, AASBAKK K, MAELAND J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [7] ZHANG K, SPARLING J, CHOW B L, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(11): 4947-4955.
- [8] 王琴,杨丽美,骆方军,等. 金黄色葡萄球菌耐药性及 mecA、qacA/B 和 pvl 基因检测 [J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 102-105.
- [9] NOGUCHI N, NAKAMINAMI H, NISHIJIMA S, et al. Antimicrobial agent of susceptibilities and anti-septic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6): 2119-2125.
- [10] 马保臣,柴同杰,秦卓明,等. 用 PCR 与 ELISA、RP-LA 对照检测乳腺炎金黄色葡萄球菌肠毒素和毒素休克综合征毒素-1 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(8): 901-905.
- [11] 夏胜超,吴聪明,王绍琛,等. 奶牛乳房炎病例中金黄色葡萄球菌毒素基因的检测 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(4): 23-24.
- [12] CARDOSO H F, SILVA N, SENA M J, et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 29(5): 347-349.
- [13] BOYNUKARA B, GULHAN T, ALISARLI M, et al. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 125(2): 209-211.
- [14] VANDERHAEGHEN W, CERPENTIER T, ADRIAENSEN C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(1-2): 166-171.

(编辑 白永平)