

猪源金黄色葡萄球菌 *vwb* 基因分布及对不同动物体外凝血致病作用的研究

张阳, 闫鹤

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为调查猪源金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)对不同动物宿主具有凝血致病作用及是否携带 *S. aureus* 凝固酶基因 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 和 *vwb^{Seq1}*, 本文以厦门地区生猪养殖场、屠宰场和终端市场分离的 130 株 *S. aureus* 为研究对象, 通过血浆凝固酶实验研究菌株对兔血浆、牛血浆和羊血浆的凝血致病性, 采用 PCR 方法对实验菌株进行 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 和 *vwb^{Seq1}* 基因的扩增。结果表明, 兔血浆、牛血浆和羊血浆的阳性凝血率分别为 100.00%、28.46%、28.46%。*S. aureus* 凝固酶 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因的检出率分别为 100.00%(130/130), 26.92%(35/130)和 26.93%(38/130), *vwb^{Seq1}* 基因未检出; 来自生猪养殖场 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因的检出率以及对牛血浆和羊血浆的阳性凝血率明显高于另外两种来源 *S. aureus*, 有显著性差异($p < 0.05$)。研究结果说明猪源 *S. aureus* 对不同动物宿主具有凝血致病作用, 为猪源 *S. aureus* 对不同动物宿主的凝血致病作用和适应性提供研究基础。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 凝固酶基因; 凝血致病性

文章编号: 1673-9078(2018)09-88-94

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.014

The Distribution of *vwb* genes and Coagulation Pathogenicity to Different Animal Hosts in Porcine *Staphylococcus aureus*

ZHANG Yang, YAN He

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this work, to investigate the coagulation pathogenicity of porcine *Staphylococcus aureus* to different animal hosts and whether they harbor staphylococcal coagulase genes of *vwb^C*, *vwb^{Sbo4}*, *vwb^{Sov2}* and *vwb^{Seq1}*, 130 *S. aureus* were isolated from swine farm, slaughterhouse and terminal market in Xiamen. Coagulation adaptability of these isolates to rabbit, bovine and goat plasma were studied by coagulase assays. The distribution of *vwb^C*, *vwb^{Sbo4}*, *vwb^{Sov2}* and *vwb^{Seq1}* genes in 130 *S. aureus* were also investigated by PCR amplification. The results showed that positive coagulation rate of 130 *S. aureus* to rabbit, bovine and goat plasma were 100.00%, 28.46% and 28.46%, respectively. The staphylococcal coagulase genes of *vwb^C*, *vwb^{Sbo4}* and *vwb^{Sov2}* were identified in 100.00% (130/130), 26.92% (35/130) and 26.93% (38/130) of all isolates, respectively. None of isolates harbored *vwb^{Seq1}* gene. The detection rates of *vwb^{Sbo4}* and *vwb^{Sov2}* genes and the positive coagulation rates of bovine and goat plasma of *S. aureus* isolated from pig farms were significantly higher than those isolated from slaughterhouse and terminal marker isolates ($p < 0.05$). This work showed that porcine *S. aureus* possessed coagulation pathogenicity to different animal hosts and provided a basis for studying on the coagulation pathogenicity and host adaptability of porcine *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; coagulation genes; coagulation adaptability

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0500606); 广东省科技计划项目(2014A020214001; 2016A020219001); 中央高校建设世界一流大学(学科)和特色发展引导专项资金(K5174960); 中央高校基本科研业务费(D2170320)

作者简介: 张阳(1991-), 男, 在读研究生, 研究方向: 食源性微生物食品安全

通讯作者: 闫鹤(1972-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品安全-微生物研究

是一种常见的人畜共患病病原菌, 能够引发人和动物的局部性化脓感染、肺炎和败血症等疾病^[1], 可以在不同动物宿主间传播, 具有广泛的宿主适应性^[2-4]。据中国卫生统计年鉴 2013~2015 报告, 在 2011~2014 年内, 我国共发生 1244 起由食源性病原微生物引起的爆发性食物中毒事件, 共导致 27479 人患病, 其中由 *S. aureus* 引发的患病人数为 3269, 占比 11.9%^[5]。该菌是污染猪肉产品引发细菌性食物中毒的主要食源性致病菌之一^[6], *S. aureus* 通过生猪养殖场环境传播至人或污染猪肉产品, 无疑会给食品安全和人的健康带来

潜在威胁。*S. aureus* 的致病性主要源于其分泌的多种致病因子, 这些致病因子包括溶血素、杀白细胞素、脱皮毒素和肠毒素等多种外毒素以及血浆凝固酶和耐热核酸酶等葡萄球菌酶^[7]。

凝固酶是 *S. aureus* 的一种重要致病因子, 能否产生有活性的凝固酶是凝固酶阳性 *S. aureus* 与凝固酶阴性葡萄球菌的重要差异之一^[8]。导致不同动物血浆凝固的致病因子为 *S. aureus* 中 *clfA* 基因编码的凝聚因子 A (ClfA)、*coa* 基因编码的凝固酶(Coa)、*vwb* 基因编码的血管性血友病因子结合蛋白(vWbp), 其中 Coa 和 vWbp 起主要作用^[9]。ClfA 在抑制 *S. aureus* 被宿主免疫细胞吞噬和侵入宿主中起到重要作用^[9]。

Coa 属于游离凝固酶, 仅通过与凝血酶原结合形成葡萄球菌凝血酶复合物, 通过位阻作用改变凝血酶原的空间结构从而发挥凝血酶的作用^[10]; 而 vWbp 被称为结合凝固酶, vWbp 介导的动物血浆凝固是 *S. aureus* 致病性的重要体现之一, vWbp 能以非蛋白水解的方式活化凝血酶原, 改变人类血液的凝血级联反应, 从而产生大量不可调控的纤维蛋白聚集体, 将 *S. aureus* 和血小板形成 *S. aureus* 微血栓, 从而增加 *S. aureus* 在血管中的粘附^[11]。

Coa 是最早发现于 *S. aureus* 中的毒力因子之一, 早在 1985 年就已经发现 Coa 的氨基酸序列及其基因 *coa* 的核酸序列, *coa* 基因分布于所有凝固酶阳性的 *S. aureus* 基因组中^[12]; 直到 2002 年, vWbp 才被 Bjerketorp 发现^[13]。vWbp 共分为两种, 一种是由染色体 *vwb^C* 编码的 vWbp^C(Chromosomal-encoded vWbp), 另一种是由致病岛 *vwb^S* 编码的 vWbp^S(SaPI-encoded vWbp)。染色体 *vwb^C* 基因存在于所有的 *S. aureus* 中, 其编码的 vWbp 能使兔血浆凝固而不能使牛血浆和羊血浆凝固, 对不同动物宿主血浆凝固适应性较差^[14]; 而致病岛 *vwb^S* 基因目前在分布于牛源、马源和羊源 *S. aureus* 中, 其编码的 vWbp 具有特异性 N 末端区域, 不仅能使兔血浆凝固同时可以使牛血浆、羊血浆、马血浆凝固, 对不同动物宿主血浆凝固适应性较强^[14]。

目前已知的 *vwb^S* 基因有 SaPIbov4 中的 *vwb^{Sbo4}*(GenBank Accession No: HM211303)、SaPIbov5 中的 *vwb^{Sbo5}*(GenBank Accession No: HM228919)、SaPIov2 中 *vwb^{Sov2}*(GenBank Accession No: CP001996) 和 SaPIeq1 中的 *vwb^{Seq1}*(GenBank Accession No: HM228920), 其中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sbo5}* 的具有相同的基因序列, 在 SaPIbov4 和 SaPIbov5 中方向相反, 且均来源于牛源 *S. aureus*^[14]。关于 *vwb^S* 基因及其所在的致病岛、基因功能等信息见表 1^[14]。

表 1 葡萄球菌凝固酶 *vwb* 基因的分布、来源及功能^[14]

Table 1 The distribution, origin and function of staphylococcal coagulase *vwb* genes^[14]

基因	分布	宿主来源	兔血	牛血	羊血
<i>vwb^C</i>	染色体	/	+	-	-
<i>vwb^{Sbo4}</i>	SaPIbov4	牛源 <i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>vwb^{Seq1}</i>	SaPIeq1	马源 <i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>vwb^{Sov2}</i>	SaPIov2	羊源 <i>S. aureus</i>	+	+	+

注: /表示 *vwb^C* 存在于所有来源 *S. aureus* 中; “+”表示血浆凝固酶阳性; “-”表示血浆凝固酶阴性。

不同动物宿主分离的 *S. aureus* 基因组有明显的差异, 表明在不同来源的 *S. aureus* 基因组中存在特定宿主适应性基因^[4,14]。Sung 等^[15]研究表明 *S. aureus* 宿主适应性基因通常位于可移动元件(mobile genetic elements, MGEs)上, 细菌可以通过获得或缺失一个或多个 MGEs 从而获得不同的宿主适应能力。近年来关于 MGEs 在细菌耐药基因和毒力基因传播中的重要作用已有较深入的研究^[16-19], 但 MGEs 在细菌对不同动物宿主适应性和致病性方面的研究较少, *S. aureus* 致病岛(Staphylococcal Pathogenic Islands, SaPIs)是一种重要的 MGEs, SaPIs 中 *vwb^S* 基因编码的 vWbp 使不同动物血浆凝固是 *S. aureus* 对不同动物宿主适应性和致病作用的重要体现之一^[14]。

猪肉在世界肉类食品中销量最大, 且一直保持增长势头。我国是生猪养殖大国, 生猪出栏量和猪肉产量基本占到世界总量的 50%^[20], 但目前国内关于 *S. aureus* 对不同动物宿主凝血致病性以及致病岛 *vwb^S* 凝固酶基因分布的研究较少, 因此全面调研生猪养殖及生鲜猪肉食品分离的 *S. aureus* 对不同动物宿主凝血致病性以及携带 *vwb^S* 凝固酶基因的状况对猪肉食品安全和人类健康具有重要意义。

厦门是我国生猪养殖区域之一, 该地区饲养的生猪是福建省猪肉食品的主要来源之一, 本研究以厦门地区生猪养殖场、屠宰场及生鲜猪肉来源的 *S. aureus* 为研究对象, 采用血浆凝固酶实验研究猪源 *S. aureus* 对兔、牛、羊血浆的凝固活性, 探究猪源 *S. aureus* 是否具有对不同动物宿主的凝血致病能力, 同时结合 PCR 方法研究猪源 *S. aureus* 是否携带 *S. aureus* 凝固酶 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 和 *vwb^{Seq1}* 基因, 初步了解这 4 种基因在生猪养殖场环境及生鲜猪肉中 *S. aureus* 的分布状况, 研究为厦门地区生猪养殖场、屠宰场及生鲜猪肉来源的 *S. aureus* 对不同动物宿主的凝血致病作用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

实验菌株为本实验室保存。自 2014 年 9 月至 12 月, 在厦门某大型生猪养殖场、屠宰车间、超市和农贸市场共采集的 501 份样品中分离检出的 130 株野生型 *S. aureus*, 样本来源及菌株分离率状况如表 2 所示。实验菌株已根据 GB 4789.10-2016 *S. aureus* 检验标准

内容鉴定为 *S. aureus*, 且每份样品仅挑选 1 个单菌落进行 *S. aureus* 判定, 以避免同一样品分离出多株相同克隆株。

此外, 通过 PCR 方法验证实验菌株均携带凝固酶 *coa* 基因。所有实验菌株已完成 MLST 分型实验, 不同来源菌株的 ST 型别分布情况见表 3。实验所用质控菌株为 *S. aureus* ATCC29213 和 *S. aureus* RN4220。

表 2 不同样品中 *S. aureus* 的分离情况

Table 2 Isolation of *S. aureus* isolates from different pork productions

样品类型	样品数量	阳性菌株 (阳性分离%)	p 值
生猪养殖场	猪鼻拭纸	97	22 (22.7%)
	养殖环境样	71	7 (9.9%)
屠宰车间	生鲜猪肉	173	62 (35.8%)
终端市场	生鲜猪肉	160	39 (24.4%)
总计	501	130 (26.0%)	<0.05

表 3 不同样品中 *S. aureus* 的 ST 型别分布

Table 3 Distribution of ST types among *S. aureus* isolates from different pork productions

ST 型别	阳性菌株数/%			总数 (n=130)
	生猪养殖场菌株 (n=29)	屠宰车间分离株 (n=62)	终端市场分离株 (n=39)	
ST1	1 (3.45%)	3 (4.84%)		4 (3.08%)
ST5		1 (1.61%)		1 (0.77%)
ST6		2 (3.23%)		2 (1.54%)
ST7		4 (6.45%)	15 (38.46%)	19 (14.62%)
ST9	22 (75.86%)	13 (20.97%)	6 (15.38%)	41 (31.54%)
ST59		2 (3.23%)	2 (5.13%)	4 (3.08%)
ST188		18 (29.03%)	7 (17.95%)	25 (19.23%)
ST239			2 (5.13%)	2 (1.54%)
ST398		2 (3.23%)	1 (2.56%)	3 (2.31%)
ST537		1 (1.61%)		1 (0.77%)
ST789			1 (2.56%)	1 (0.77%)
ST1092	2 (6.90%)			2 (1.54%)
ST1516			4 (10.26%)	4 (3.08%)
ST2196	1 (3.45%)	2 (3.23%)	1 (2.56%)	4 (3.08%)
ST3387	2 (6.90%)	8 (12.90%)		10 (7.69%)
ST4292	1 (3.45%)	1 (1.61%)		2 (1.54%)
ST4293		2 (3.23%)		2 (1.54%)
ST4294		1 (1.61%)		1 (0.77%)
ST4295		1 (1.61%)		1 (0.77%)
ST4297		1 (1.61%)		1 (0.77%)

1.2 仪器与设备

Gene Amp PCR system 2700, 美国 Applied Biosystems 公司; GelDocEQ 凝胶成像系统, 美国 BIO-RAD 公司; 核酸电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司; 高速离心机, 美国 Thermo 公司; 恒温培养箱, 德国

Binder 公司; 恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 培养基和主要试剂

脑心浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion Broth, BHI), 广州环凯微生物科技有限公司; 细菌基因组

DNA 快速提取试剂盒,北京博迈德生物技术有限公司; TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL)、dNTPs、2000 bp DNAMarker、琼脂糖,日本 TaKaRa 公司; 兔血浆、牛血浆、羊血浆,广州鸿泉生物科技有限公司; 溶菌酶,德国 Sigma 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株的活化及 DNA 的提取

将保存于实验室-80 °C 冰箱的菌株划线接种至 BHI 琼脂平板,在 37 °C 的恒温培养箱中过夜培养,然后挑取单菌落至 BHI 肉汤中,37 °C 培养 10~16 h。*S. aureus* 的 DNA 提取按照细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书进行。

1.4.2 血浆凝固酶实验

分别取 0.5 mL 新鲜兔血浆、牛血浆和羊血浆分装于无菌试管中,再各加入含 1×10⁸ CFU/mL 待检菌株肉汤过夜培养物 0.2 mL,置于 37 °C 恒温培养箱内,每隔 30 min 观察一次并记录实验结果,连续观察 6 h。评定结果:如呈现凝固(即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块)或凝固体积大于原体积的一半,被判定为阳性结果。*S. aureus* ATCC29213 和 *S. aureus* RN4220 分别作为阳性和阴性对照。

1.4.3 血管性血友病因子结合蛋白基因 *vwb* 的扩增及引物的合成

为验证实验菌株是否携带 *S. aureus* 凝固酶 *vwb*^C、*vwb*^{Sbo4}、*vwb*^{Sov2} 和 *vwb*^{Seq1} 基因,所有菌株进行这 4 种 *vwb* 基因的 PCR 扩增,PCR 阳性产物送至上海美吉生物医药科技有限公司测序,将测序结果在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站对测得的序列进行分析,应用 Standard Nucleotide BLAST 对获得的基因序列进行同源性检索。引物均由上海生工生物股份有限公司合成。引物序列及片段长度如表 4 所示。

表 4 *vwb* 基因引物序列与 PCR 扩增产物大小

Table 4 The information of *vwb* and its primer sequence and size of the amplification product by PCR

基因	引物序列 (5'-3')	长度
<i>vwb</i> ^C	AGGGTGTAAGGTAGGTTG	1268
	GATGCGTTGTTGTGAAAT	
<i>vwb</i> ^{Sbo4}	TAAATAGGCACGCAGGAT	1062
	TACCAGGTAAAGCAGACG	
<i>vwb</i> ^{Seq1}	TTTTGGAGCTGTTGACGG	1076
	TACCAGGTAAAGCAGACGA	
<i>vwb</i> ^{Sov2}	TTTGATGACCTGCACCTTA	1410
	CACAACCTTTGGAATAGCG	

1.4.4 数据处理

采用 spss 19.0 软件进行统计学处理,计数资料用 χ^2 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 血浆凝固酶实验结果

2.1.1 *S. aureus* 对不同动物血浆的阳性凝血率

不同来源的 *S. aureus* 对兔血浆、牛血浆和羊血浆的血浆凝固酶实验结果见表 5。

130 株 *S. aureus* 对兔血浆、牛血浆和羊血浆的阳性凝血率分别为 100.00%、28.46% 和 28.46%。不同来源的 *S. aureus* 对 3 种不同动物血浆的阳性凝血率不同。生猪养殖场分离株对 3 种血浆的阳性凝血率最高,均为 100.00%; 屠宰场和终端市场分离的 *S. aureus* 对兔血浆的阳性凝血率为 100.00%,但对牛血浆和羊血浆的阳性凝血率均较低,屠宰车间分离株对牛血浆和羊血浆的阳性凝血率均为 11.29%,终端市场分离株对牛血浆和羊血浆的阳性凝血率均为 2.56%。

表 5 130 株 *S. aureus* 血浆凝固酶实验结果

Table 5 The result of coagulase test with 130 *S. aureus* isolates from different pork production

菌株来源	阳性率(不同来源中阳性菌株数/相应来源的菌株总数)			
	兔血浆	牛血浆	羊血浆	
生猪养殖场	猪鼻拭纸样(22)	100.00% (22/22)	100.00% (22/22)	100.00% (22/22)
	环境样(7)	100.00% (7/7)	100.00% (7/7)	100.00% (7/7)
屠宰车间	生鲜猪肉(62)	100.00% (62/62)	11.29% (7/62)	11.29% (7/62)
终端市场	生鲜猪肉(39)	100.00% (39/39)	2.56% (1/39)	2.56% (1/39)
总计(130)		100.00% (130/130)	28.46% (37/130)	28.46% (37/130)

2.1.2 不同动物血浆的菌株凝血速率

本研究中不同来源的 *S. aureus* 对兔血浆、牛血浆和羊血浆的凝血速率存在差异, *S. aureus* 对兔血浆的凝血速率快于对牛血浆和羊血浆的凝血速率。130 株

S. aureus 对兔血浆的阳性凝血率为 100.00%,且在 0.5 h 内使兔血浆达到完全凝固。实验菌株对牛血浆和羊血浆凝固酶速率实验结果如表 6 和表 7 所示,生猪养殖场中猪鼻拭纸和养殖环境分离的 *S. aureus* 均可使牛

血浆和羊血浆在 1 h 内完全凝固, 而屠宰车间和终端市场生鲜猪肉分离的 *S. aureus* 中分别只有 6 株和 1 株 *S. aureus* 可以使牛血浆和羊血浆在 1 h 内完全凝固。此外, 屠宰场生鲜猪肉分离株中有 1 株 *S. aureus* 可以

同时使牛血浆和羊血浆在 4 h 内完全凝固。通过分析不同来源的 *S. aureus* 对兔血浆、牛血浆和羊血浆凝血速率实验结果发现, 生猪养殖场分离株对 3 种血浆的凝血速率快于屠宰场和终端市场分离株。

表 6 130 株 *S. aureus* 牛血浆凝固酶速率实验结果

Table 6 The result of bovine plasma coagulase test with 130 *S. aureus* isolates from different pork production

菌株来源	不同观察时间(h)内血浆凝固酶菌株阳性率						
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	
生猪养殖场	猪鼻拭纸样(22)	100%(22/22)	0	0	0	0	0
	环境样(7)	100%(7/7)	0	0	0	0	0
屠宰车间	生鲜猪肉(62)	9.68%(6/62)	0	0	1.61%(1/62)	0	0
终端市场	生鲜猪肉(39)	2.56%(1/39)	0	0	0	0	0
总计(130)		27.69%(36/130)	0	0	0.77%(1/130)	0	0

表 7 130 株 *S. aureus* 羊血浆凝固酶速率实验结果

Table 7 The result of caprine plasma coagulase test with 130 *S. aureus* isolates from different pork production

菌株来源	不同观察时间(h)内血浆凝固酶菌株阳性率						
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	
生猪养殖场	猪鼻拭纸样(22)	100%(22/22)	0	0	0	0	0
	环境样(7)	100%(7/7)	0	0	0	0	0
屠宰车间	生鲜猪肉(62)	9.68%(6/62)	0	0	1.61%(1/62)	0	0
终端市场	生鲜猪肉(39)	2.56%(1/39)	0	0	0	0	0
总计(130)		27.69%(36/130)	0	0	0.77%(1/130)	0	0

2.2 *S. aureus* 中致病岛凝固酶基因 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 的分布情况

130 株实验菌株中 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 和 *vwb^{Seq1}* 基因的扩增结果见图 1。由图 1 可知, 除 *vwb^{Seq1}* 基因在实验菌株中未检出外, *S. aureus* 凝固酶 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 基因均扩增出相应目标条带, 且与 GeneBank 中对应目的基因的同源性为 99%。

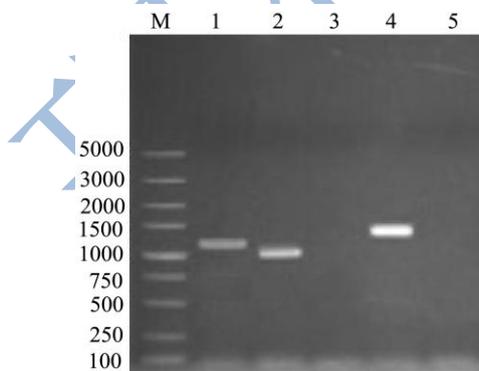


图 1 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}* 和 *vwb^{Seq1}* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 The amplification results of *vwb^C*, *vwb^{Sbo4}*, *vwb^{Sov2}* and *vwb^{Seq1}* genes by PCR

注: Lane M: 5000 bp DNA Marker; Lane 1: *vwb^C*; Lane 2: *vwb^{Sbo4}*; Lane 3: *vwb^{Seq1}*; Lane 4: *vwb^{Sov2}*; Lane 5: 空白对照。

根据 PCR 的检测结果, 130 株 *S. aureus* 中 *vwb^C*、*vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 凝固酶基因的检出率分别为 100.00%, 26.92% 和 29.23%, 结果见表 8。不同样本来源的 *S. aureus* 中均以 *vwb^C* 基因的检出率最高, 达 100.00%, 说明 *vwb^C* 基因存在于所有的 *S. aureus* 染色体基因组中, 与 David Viana 等的研究结论一致^[14]。本研究中 *vwb^{Sbo4}*、*vwb^{Sov2}*、*vwb^{Seq1}* 基因的检出率明显比 *vwb^C* 基因的检出率低, 其中 *vwb^{Sbo4}* 检出率为 26.92%, 高于 David Viana 研究中 *vwb^{Sbo4}* 的检出率 18.42%; *vwb^{Sov2}* 检出率为 29.23%, 高于 David Viana 研究中 *vwb^{Sov2}* 的检出率 23.68%, 但值得注意的是 David Viana 研究中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因全部分布在牛、羊和马源的金葡菌中, 在猪源 *S. aureus* 中并未检出^[14], 而本研究中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因全部分布于猪源 *S. aureus* 中。此外, Caitriona M 等对牛和羊乳腺炎来源的 29 株 *S. aureus* 研究发现 37.93% (11/29) 的菌株携带有 *vwb^{Sov2}* 基因^[4], 高于本研究猪株 *S. aureus* 中 *vwb^{Sov2}* 的检出率 29.23%。目前国内对 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因流行情况的研究相对较少, 2016 年 Yan 等利用全基因组测序技术对中国哈尔滨健康生猪分离的 3 株 *S. aureus* 进行基因结构分析中, 发现 3 株 *S. aureus* 全部携带有 *vwb^{Sbo4}* 基因^[21]。不同来源 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因的检出率有所不同, 这可能

与实验菌株数量或采样地点、国家等因素有关。

不同来源的 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因的携带率不同, 并且存在一定的差异。生猪养殖场中猪鼻拭纸样品和环境样品分离 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 具有相同的检出率, 均为 95.45%; *vwb^{Sov2}* 在猪鼻拭纸样品和环境样品分离 *S. aureus* 中的检出率也相同, 均为 85.71%。屠宰场生鲜猪肉样品分离 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 的检出率分别为 11.29% 和 12.90%, 终端市场生鲜猪肉样品分离 *S. aureus* 中 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 的检出率分别为 2.56% 和 7.69%。实验结果表明 *S. aureus* 致病岛凝固酶基因 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 在生猪养殖场分离 *S. aureus* 中的检出率明显高于在屠宰场和终端市场分离 *S. aureus* 的检出率, 且差异具有统计学意义

($p < 0.05$)。

从总的分布规律来看, 菌株同时携带有 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因的几率较高, 在生猪养殖场中, 95.45% (21/22) 的猪鼻拭纸样品分离株和 85.71% (6/7) 环境样品分离株同时被检测出 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}*; 在屠宰场和终端市场生鲜猪肉样品分离株中分别有 6 株 *S. aureus* 和 1 株 *S. aureus* 同时携带 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 结果表明生猪养殖场分离的 *S. aureus* 同时携带 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 的比率高于生鲜猪肉样品分离的 *S. aureus*, 说明生猪养殖场中 *S. aureus* 更易捕获致病岛凝固酶 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 可能是由于活猪或养殖环境作为 *S. aureus* 的传播媒介更容易被定殖或感染多种来源的 *S. aureus*。

表 8 130 株 *S. aureus* 中不同类型 *vwb* 基因的检出率

Table 8 Detection of different kinds of *vwb* genes in 130 *S. aureus* isolates from different pork production

菌株来源		基因的检出率(不同来源中阳性菌株数/相应来源的菌株总数)			
		<i>vwb^C</i>	<i>vwb^{Sbo4}</i>	<i>vwb^{Sov2}</i>	<i>vwb^{Seq1}</i>
生猪养殖场	猪鼻拭纸样(22)	100.00%(22/22)	95.45%(21/22)	95.45%(21/22)	0
	环境样(7)	100.00%(7/7)	85.71%(6/7)	85.71%(6/7)	0
屠宰车间	生鲜猪肉(62)	100.00%(62/62)	11.29%(7/62)	12.90%(8/62)	0
	终端市场	生鲜猪肉(39)	100.00%(39/39)	2.56%(1/39)	7.69%(3/39)
总计(130)		100.00%(130/130)	26.92%(35/130)	29.23%(38/130)	0

2.3 血浆凝固酶实验与 *vwb* 基因检测结果对比分析

从兔血浆凝固酶实验表型和相应的凝固酶基因检测结果分析, 130 株猪源 *S. aureus* 均能使兔血浆在 0.5 h 内凝固, 且实验菌株均携带凝固酶 *vwb^C* 和 *coa* 基因, 说明所有实验菌株的兔血浆凝固酶表型与其所携带的凝固酶基因表达结果保持一致。

从牛和羊血浆凝固酶实验表型与相应的凝固酶基因检测结果分析, 130 株 *S. aureus* 中, 54.62% (71/130) 的 *S. aureus* 对这两种血浆的凝固酶表型均为阴性, 且不含 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 说明本研究中牛血浆和羊血浆凝固酶表型与所携带的 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因结果一致。在牛和羊血浆凝固酶阳性表型和相应的凝固酶 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因阳性菌株中, 26.92% (35/130) 的 *S. aureus* (尤其是生猪养殖场分离株) 同时携带有 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 且可以使牛血浆和羊血浆在 1 h 内完全凝固, 这一结果表明可能是 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 两种基因协同作用促使 *S. aureus* 对牛血浆和山血浆具有较快的凝血速率; 在屠宰场生鲜猪肉分离株中有 1 株携带 *vwb^{Sbo4}* 基因的 *S. aureus* 可以使牛血浆和羊血浆在 4 h 内凝固, 而 3 株携带 *vwb^{Sov2}* 基因的 *S. aureus*

不能使牛血浆和羊血浆在实验观察 6 h 内凝固, 说明 *vwb^{Sbo4}* 基因的凝血致病作用比 *vwb^{Sov2}* 基因的凝血致病作用强。此外, 实验发现在生猪养殖场环境样分离的 *S. aureus* 中有 1 株不携带有 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 但能使牛血浆和羊血浆在 1 h 内凝固, 说明在 *S. aureus* 中可能存在其他机制导致牛血浆和羊血浆凝固, 这一现象需要进一步深入研究。

3 结论

3.1 本实验首次检测到猪肉生产链中生猪养殖场、屠宰场和终端市场三个环节分离的 *S. aureus* 对兔血浆、牛血浆和羊血浆具有凝血致病作用, 同时通过 PCR 扩增检测到 *vwb^C*, *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 3 种 *S. aureus* 凝固酶基因, 说明猪源 *S. aureus* 对不同动物宿主具有适应性和凝血致病作用。

3.2 *S. aureus* 凝固酶 *vwb^C* 基因的检出率最高, *vwb^{Seq1}* 基因未检出, *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 的检出率在生猪养殖场猪鼻拭纸和养殖环境分离的 *S. aureus* 明显高于屠宰场和终端市场生鲜猪肉分离的 *S. aureus*。

3.3 所有菌株对兔血浆凝固酶实验表型为阳性, 且均在 0.5 h 内凝固, 对牛血浆和羊血浆凝固酶实验表型多样, 生猪养殖场中猪鼻拭纸和养殖环境分离 *S. aureus* 对牛血浆和羊血浆的阳性凝血率和速率快于屠宰场和

终端市场生鲜猪肉分离 *S. aureus*。

3.4 通过血浆凝固酶实验和 *vwb* 基因检测结果对比分析发现: *S. aureus* 同时携带有 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因对牛血浆和羊血浆的凝血速率比只携带 *vwb^{Sbo4}* 或 *vwb^{Sov2}* 基因对牛血浆和羊血浆的凝血速率快, 这一现象可能是 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 两种基因协同作用的结果; 存在 1 株 *S. aureus* 不携带 *vwb^{Sbo4}* 和 *vwb^{Sov2}* 基因, 但可以使牛血浆和羊血浆在 1 h 内完全凝固, 可能是 *S. aureus* 中可能存在其他机制导致牛血浆和羊血浆凝固, 这一现象需要进一步实验研究。

参考文献

- [1] Smith T C, Gebreyes W A, Abley M J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e 63704
- [2] Spoor L E, McAdam P R, Weinert L A, et al. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. MBio, 2013, 4(4): 16
- [3] Price L B, Stegger M, Hasman H, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock [J]. MBio, 2012, 3(1)
- [4] Guinane C M, Ben Z N, Tormo-Mas M A, et al. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation [J]. Genome Biology Evolution, 2010, 2: 454-466
- [5] Wu S, Duan N, Gu H, et al. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(7): 176
- [6] Song M, Bai Y, Xu J, et al. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 195: 1-8
- [7] Ote I, Taminiou B, Duprez J, et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis [J]. Veterinary Microbiology, 2011, 153(3-4): 285-292
- [8] Malachowa N, Kobayashi S D, Porter A R, et al. Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e01582936
- [9] Cheng A G, McAdow M, Kim H K, et al. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(8): e1001036
- [10] 罗东, 万腊根, 陈开森. 金黄色葡萄球菌促凝因子研究进展 [J]. 实验与检验医学, 2017, 35(3): 293-296
- LUO Dong, WAN La-gen, CHEN Kai-sen. Research progress of *Staphylococcus aureus* coagulant-promoting factors [J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2017, 35(3): 293-296
- [11] Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, et al. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation [J]. Nature, 2003, 425 (6957): 535-539
- [12] Adesiyun A A, Shehu L M. Detection of staphylo-coagulase using plasmas from various animals. [J]. Veterinary Microbiology, 1985, 10(4): 387-392
- [13] Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh A, et al. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiology, 2002, 148(7): 2037-2044
- [14] Viana D, Blanco J, Tormo-Mas M A, et al. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein [J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(6): 1583-1594
- [15] Sung J M, Lloyd D H, Lindsay J A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray [J]. Microbiology, 2008, 154(7): 1949-1959
- [16] Novick R P, Christie G E, Penades J R. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(8): 541-551
- [17] Sato O Y, Omoe K, Ono H K, et al. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands [J]. Microbiology Immunology, 2013, 57(2): 91-99
- [18] Mc Carthy A J, Witney A A, Gould K A, et al. The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country [J]. Genome Biology and Evolution, 2011, 3: 1164-1174
- [19] Luo P, Jiang H, Wang Y, et al. Prevalence of mobile genetic elements and transposase genes in *Vibrio alginolyticus* from the southern coastal region of China and their role in horizontal gene transfer [J]. International Microbiology, 2012, 15(4): 201-210
- [20] Zhou L, Ying G, Liu S, et al. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China [J]. Science of The Total Environment, 2013, 444(2): 183-195
- [21] Yan X, Li Z, Chlebowicz M A, et al. Genetic features of

livestock-associated *Staphylococcus aureus* ST9 isolates from Chinese pigs that carry the *lsa(E)* gene for quinupristin/

dalfopristin resistance [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2016, 306(8): 722-729

