

## 猪肉源金黄色葡萄球菌生物膜能力与 MLST 分型检测

韩国全, 吴任之, 张翼, 饶均钊, 曹芸榕, 杨茂杰  
(四川农业大学食品学院 食品加工与安全研究所 四川雅安 625014)

**摘要** 金黄色葡萄球菌在生鲜猪肉中有较高的检出率,是污染生鲜猪肉的主要食源性致病菌之一,对食品安全和人体健康造成巨大威胁。采用刚果红琼脂法定性,96孔微量板定量结合扫描电镜检测其成膜能力,用PCR法检测其成膜基因和黏附基因,最后对分离株进行多位点序列分型分析(MLST)。结果表明,刚果红琼脂法定性试验显示84.93%(62/73)的菌株成生物膜阳性,96孔微量板定量试验显示94.52%(69/73)的菌株成生物膜阳性,扫描电镜观察到不同黏附能力的菌株在钢板上梯度富集,PCR试验发现分离株均含有多重黏附基因,其中同时携带 $icaD$ 、 $clfA$ 、 $clfB$ 、 $fnbA$ 、 $fnbB$ ;  $icaD$ 、 $clfA$ 、 $clfB$ 、 $fnbA$ 、 $fnbB$ 、 $cna$ ;  $icaA$ 、 $icaD$ 、 $clfA$ 、 $clfB$ 、 $fnbA$ 、 $fnbB$ 、 $cna$ 多重黏附基因的菌株数最多,分别为30.14%(22/73),20.55%(15/73),15.07%(11/73)。MLST试验中73株菌分为26个ST型,夏季20个、冬季12个,夏季以CC1、CC5为优势克隆群,冬季以CC15、CC1、CC5为优势克隆群。系统发育树中,分离株与国内食源性、医源性和动物源性分离株有一定的相关性,呈现遗传多样性。研究结果可为生鲜猪肉的安全监管和金黄色葡萄球菌的传播及溯源调查提供一定的科学依据。

**关键词** 猪肉;金黄色葡萄球菌;生物膜;多位点序列分型

**文章编号** 1009-7848(2023)07-0353-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.036

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)生物膜(Biofilm)是一种微生物群落,嵌在由聚合物组成的自生细胞外间质中,使微生物逃避先天免疫系统的作用,与浮游的活跃生长培养物相比,生物膜中的细胞耐药性更强,导致伤口愈合时间延长或形成不可愈合创口<sup>[1]</sup>。针对金黄色葡萄球菌生物膜的检测方法有很多,包括刚果红法、96孔微量板定量检测法、激光共聚焦扫描显微镜等。生物膜基因( $bap$ 、 $icaA$ 、 $icaD$ )、黏附相关基因( $fnbA$ 、 $fnbB$ 、 $clfA$ 、 $clfB$ 、 $cna$ )等均是导致其成膜的重要因素,其中合成细胞间黏附多糖的 $icaA$ 、 $D$ 、 $B$ 、 $C$ 操纵子的表达至关重要。Bazari等<sup>[2]</sup>研究证明,金黄色葡萄球菌胞外多糖层与生物膜的形成有一定关系,分离株中 $icaA$ 、 $D$ 基因的存在与体外生物膜的形成无关。 $clfA$ 、 $clfB$ 是导致金黄色葡萄球菌黏附的主要因素之一。目前针对牛乳或者牛乳腺炎中该基因的研究较多,而针对生鲜猪肉的研究极少。Ren等<sup>[3]</sup>发现奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌分离株的 $clfA$ 、 $clfB$ 基因的检出率为100%。

在探索金黄色葡萄球菌生物膜形成能力同

时,也需要进行多位点序列分型分析(MLST),该分型结果可在不同实验室、地区甚至国家之间进行对比,进行全球性的流行病学调查研究。截至2021年12月,金黄色葡萄球菌数据库中包含7330种ST型,不同金黄色葡萄球菌管家基因片段因不同的等位基因而有不同序列,扩增管家基因后测序,与MLST数据库(<http://www.mlst.net>)中的序列进行比较,即可获得等位基因谱和相应的ST型。王琦等<sup>[4]</sup>总结了亚洲、北美洲、欧洲金黄色葡萄球菌的ST起源及流行现状,ST59、ST72、ST772是起源于亚洲的金黄色葡萄球菌分型,ST5/USA100、ST1/USA400、ST8/USA300是北美洲主要的ST型,医院获得克隆ST22/EMRSA-15和动物中流行的ST398都首先出现于欧洲。随着时代和社会的发展,这些ST型也在不同地区、宿主中交叉传播。

鉴于金黄色葡萄球菌的生物膜及不同ST型对其耐药性、致病性等方面的较大影响,本研究对前期从雅安市生鲜猪肉中分离的金黄色葡萄球菌进行生物膜的形成和MLST分型检测,分析分离株的成膜机制及遗传多样性,同时完善金黄色葡萄球菌的MLST数据库。

收稿日期:2022-07-14

第一作者:韩国全,男,博士,副教授

E-mail: hans\_980306@sicau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

试验用 73 株金黄色葡萄球菌为本团队前期从雅安市生鲜猪肉中分离所得,夏季 37 株,冬季 36 株<sup>[5]</sup>;标准菌株:金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923),表皮葡萄球菌标准菌株(ATCC 12228),由四川农业大学食品学院微生物团队保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

刚果红琼脂:BHI 肉汤 37 g/L,蔗糖 36 g/L,刚果红 0.8 g/L,琼脂 10 g/L,121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min; Baird-Parker 琼脂平板、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、脑心浸出液肉汤(BHI);聚合酶链式反应应用 2×Taq Master Mix、DL2000 DNA Marker、引物(成都擎科生物技术有限公司)。

LMQ.C-100E 自动高压灭菌器,山东新华医疗器械股份有限公司;T100 型 PCR 仪、SUB-CELLGT 水平电泳槽、GELDOXR 凝胶成像分析仪,美国 Bio-Rad 公司;S4800 场发射扫描电镜,日本日立公司;Varioskan LUX 酶标仪,赛默飞世尔科技公司;麦氏比浊仪,法国梅里埃公司。

### 1.3 方法

1.3.1 刚果红琼脂试验 挑取单菌落接种于 TSB 培养基,37 °C,180 r/min 培养过夜,将培养好的细菌划线于刚果红琼脂平板,37 °C 培养 18 h,置于室温 72 h 后观察菌落特点。产生物膜的菌落为黑色,不产生物膜的菌落为红色,试验重复 3 次<sup>[6-7]</sup>。

1.3.2 96 孔微量板定量检测试验 通过酶标仪测量菌株在 96 微孔板中生长后的吸光度值,进行金黄色葡萄球菌生物膜形成定量研究。具体操作参照 Wang 等<sup>[8]</sup>和张阳<sup>[9]</sup>的方法:挑取单菌落接种于 TSB 培养基中,37 °C 过夜培养,将菌液稀释至 0.5 麦氏浊度,备用。将 200 μL 含 1% 葡萄糖的新鲜 TSB(TSB<sub>glc</sub>)培养基分别加入 96 微孔板中,再取上述菌液按 1% 的接种量加入 96 微孔板中。金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为阳性对照,表皮葡萄球菌标准菌株 ATCC 12228 作为阴性对照,TSB<sub>glc</sub> 培养基作为试剂空白。37 °C 培养 72 h 后弃去菌液,用 200 μL PBS 洗涤 3 次,200 μL 甲醇固定 20 min 后弃去,自然干燥,用 200 μL 0.4% 结晶紫染色 15 min,再用无菌 PBS 洗涤 3 次,自然风

干,最后用 200 μL 33% 冰醋酸溶解 30 min,酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度值,OD 值反映生物膜与接触表面黏附的牢固程度,试验重复 3 次。

依据临界 OD<sub>c</sub> 值(OD<sub>c</sub> 等于空白孔的平均值加上其 3 倍标准差)对生物膜分类<sup>[8-9]</sup>:OD ≤ OD<sub>c</sub> 为不黏附,OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2OD<sub>c</sub> 为弱黏附,2OD<sub>c</sub> < OD ≤ 4OD<sub>c</sub> 为中等黏附,OD > 4OD<sub>c</sub> 为强黏附。

1.3.3 生物膜扫描电镜观察 锈钢片的清洗:丙酮浸泡不锈钢片(1.0 cm×1.0 cm)除去表面油脂,然后把不锈钢片放在 5 mol/L 盐酸溶液中浸泡 15 min,用洗涤剂清洗,再用蒸馏水冲洗干净。最后把不锈钢片放入 18 mm×180 mm 试管中,加入 10 mL TSB 培养基,灭菌<sup>[10]</sup>。

接种培养:将不同黏附能力的菌株在 TSB 培养基中 37 °C,180 r/min 培养 6~8 h,按 1% 的接种量接入上述试管中,37 °C 培养 48 h。

样品制备:不锈钢片用 PBS 溶液冲洗 2 次,去除浮游菌,用 2.5% 戊二醛溶液固定至少 2 h 后,用 PBS 冲洗 2 次,依次用 30%,50%,70%,99% 的乙醇脱水 15 min,经醋酸乙酯置换、临界点干燥仪干燥、喷金,经过扫描电镜观察生物膜微观形态,观察其是否能够在不锈钢片上形成不同密度的生物膜,试验重复 3 次。

1.3.4 生物膜基因检测 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌的成膜基因和黏附基因,分析被膜基因与表型之间的相关性。成膜基因包括:*bap*、*icaA*、*icaD*,黏附基因包括:*fnbA*、*fnbB*、*clfA*、*clfB*、*can*<sup>[8]</sup>。PCR 反应体系为 PrieSTAR mix 12.5 μL,模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 扩增条件见表 5。将反应好的 PCR 产物吸取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测(121 V,30 min)后,观察目的条带。

1.3.5 MLST 分型 根据 MLST 数据库(<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus/primers>)提供的 7 对管家基因(*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqiL*)的引物序列及条件进行 PCR 扩增,将反应好的 PCR 产物送至有康生物科技有限公司进行双向测序。将返回的测序结果使用 DNASTAR 软件进行拼接后,上传至金黄色葡萄球菌多位点分型数据库,以检索出等位基因谱和相应的 ST 型。若上传的数据无法检索出部分等位基因型或

表 1 PCR 扩增引物序列及退火温度

Table 1 PCR primer sequence and annealing temperature

基因	引物	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	产物长度/bp
<i>bap</i>	bap-F	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	60	971
	bap-R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		
<i>icaD</i>	icaD-F	AAACGTAAGAGAGGTGG	49	381
	icaD-R	GGCAATATGATCAAGATAC		
<i>fnbA</i>	fnbA-F	GATACAAAACCCAGGTGGTGG	52	191
	fnbA-R	TGTGCTTGACCATGCTCTTC		
<i>fnbB</i>	fnbB-F	ACGCTCAAGCGCAGCGCAAAG	62	197
	fnbB-R	ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT		
<i>clfA</i>	clfA-F	CCGGATCCGTAGCTGCAGATGCACC	60	1000
	clfA-R	GCTCTAGATCACTCATCAGGTTGTTTCAGG		
<i>clfB</i>	clfB-F	TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAAC	62	194
	clfB-R	CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTC		
<i>cna</i>	cna-F	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGAC	54	192
	cna-R	AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		

检索出全部等位基因型,而无相应的 ST 型,则需在该网站中上传序列和等位基因谱。

1.3.6 MLST 分组和聚类分析 使用 PHYLOViZ v2.0a 软件,基于 goeBURST 算法将分离株的 ST 型分为不同的 BGs(BURST group),达到分组和聚类的作用。

1.3.7 分离株遗传进化分析 使用 MEGA11 软件将本研究得到的 ST 型与国内 3 种医源性 ST 型(ST6754 食物中毒分离、ST4957 皮肤感染伤口拭子、ST7064 菌血症)、3 种动物源型 ST 型(ST7181 奶牛乳腺炎、ST6556 健康猪、ST6267 牦牛)和 3 种食源性 ST 型(ST6650 鸡肉、ST5715 猪肉、ST5731 凉面)结合分析,以研究分离株的遗传特性。

1.3.8 数据统计方法 使用 Excel、SPSS 软件进行数据整理与分析,PHYLOViZ v2.0a 软件进行聚类分析,MEGA11 软件进行遗传进化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 刚果红定性结果

刚果红琼脂试验中,84.93%(62/73)的菌株为生物膜阳性菌株,夏季和冬季分离株的差异不大,2 株冷藏样品分离株均为生物膜阳性,15.07%(11/73)的菌株为生物膜阴性菌株,夏季分离株的阴性检出率明显高于冬季(表 2)。

### 2.2 96 孔微量板定量检测

对 73 株菌进行 96 孔微量板定量检测,形成强黏附菌株最多,占 61.64%(45/73),中黏附菌株占 20.55%(15/73),弱黏附菌株占 12.33%(9/73),不黏附即不形成生物膜的菌株最少,占 5.48%(4/73)。夏季、冬季和常温样品菌株的强黏附能力菌株数均最多,不黏附的菌株最少。2 株冷藏样品分离株中,1 株为不黏附,1 株为中黏附(表 3)。

表 2 刚果红琼脂试验结果

Table 2 Congo red test results

结果	夏季检出率/	冬季检出率/	总检出率/
	%	%	%
阳性	81.08	88.89	84.93
阴性	18.92	11.11	15.07

表 3 96 孔微量板定量检测结果

Table 3 Quantitative detection results of 96-well microplate

结果	夏季检出率/	冬季检出率/	总检出率/
	%	%	%
强黏附	64.86	58.33	61.64
中黏附	21.62	19.44	20.55
弱黏附	10.81	13.89	12.33
不黏附	2.70	8.33	5.48

### 2.3 生物膜扫描电镜结果

利用扫描电镜更为直观的确定上述方法中的菌株是否能在钢板糙面上黏附,形成不同密度的菌体细胞。黏附能力强的菌株能在钢板上形成致

密的细胞(图 1a),中等成膜能力的菌株在钢板上数量中等(图 1b),形成弱生物膜的菌在钢板上数量最少,分布稀疏(图 1c),图 1d 为空白对照。

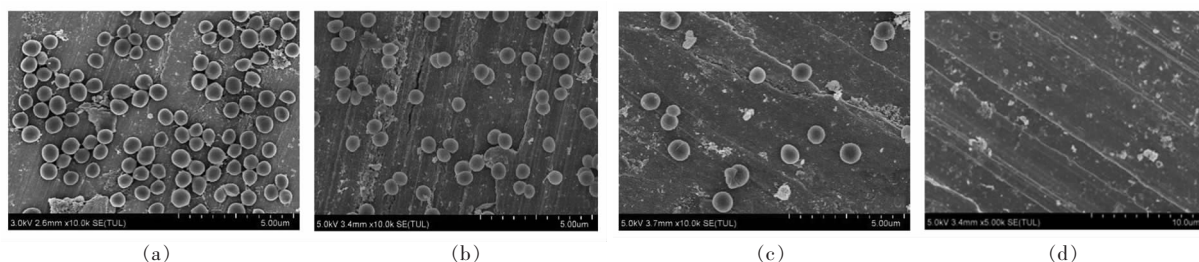


图 1 扫描电镜下金黄色葡萄球菌的形态

Fig.1 Morphology of *S. aureus* under scanning electron microscope

### 2.4 生物膜基因检测结果

73 株菌均携带生物膜基因, *fnbA*、*clfB* 检出率最高,为 100%。成膜基因 *icaA*、*icaD* 和 *bap* 的检出率分别为 30.14%、93.15%和 0。黏附基因 *fnbB*、*clfA*、*cna*、检出率分别为 95.89%、86.30%、46.58%。夏季检出率较高的基因为 *fnbA*、*clfB*、*fnbB*、*icaD*、*clfA*。冬季菌株中, *fnbA*、*fnbB*、*clfB*、*icaD* 检出率最高(表 4)。

多重生物膜基因结果显示,12.33%菌检出 4 种生物膜基因,38.36%的菌检出 5 种生物膜基因,34.25%的菌检出 6 种生物膜基因,15.07%的菌检出 7 种生物膜基因(表 5)。

### 2.5 金黄色葡萄球菌 MLST 分型情况

73 株金黄色葡萄球菌有 11 株未能分型,占 15.07%,夏季 6 株,冬季 5 株,其余分离株分为 26

个 ST 型,其中 7 个 ST 型是本研究首次发现并上传至数据库,分别是:ST6770、ST6771、ST6772、ST6775、ST6781、ST6782、ST6990。

在已分型的菌株中,ST188 (16.13%,10/62),ST88 (14.52%,9/62),ST15 (12.90%,8/62),ST398 (9.68%,6/62)4 种 ST 型的检出率相对较高。26 个 ST 型中有 31 株菌无克隆群(50.79%),其余菌株分为 6 个克隆群,CC1 (24.19%,15/62)、CC15 (16.13%,10/62)、CC5(6.45%,4/62)、CC8(1.61%,1/62)、CC22(1.61%,1/62)(表 6)。

2.5.1 不同季节分离株 MLST 分型情况 不同季节生鲜猪肉中金黄色葡萄球菌 MLST 分型情况见表 7,夏季 37 株分离株共有 20 种 ST 型,优势 ST 型有 5 种:ST1、ST88、ST398、ST188 和 ST25。冬季 36 株分离株共有 12 种 ST 型,优势 ST 型有 5 种:

表 4 金黄色葡萄球菌生物膜基因检出情况

Table 4 Detection of biofilm genes of *S. aureus*

基因	夏季		冬季		总检出数/株	总检出率/%
	检出数/株	检出率/%	检出数/株	冬季检出率/%		
<i>icaA</i>	9	24.32	13	36.11	22	30.14
<i>icaD</i>	32	86.49	36	100.00	68	93.15
<i>clfB</i>	37	100.00	36	100.00	73	100.00
<i>bap</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>cna</i>	18	48.65	16	44.44	34	46.58
<i>clfA</i>	28	75.68	35	97.22	63	86.30
<i>fnbB</i>	34	91.89	36	100.00	70	95.89
<i>fnbA</i>	37	100.00	36	100.00	73	100.00

表 5 金黄色葡萄球菌多重生物膜基因携带情况

Table 5 Carrying status of multiple biofilm genes of *S. aureus*

基因数	基因组合	菌株数	百分比/%
4	<i>icaD</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i>	4	5.48
	<i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i>	3	4.11
	<i>icaD</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>Cna</i>	1	1.37
	<i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i> 、 <i>Cna</i>	1	1.37
5	<i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i>	22	30.14
	<i>icaD</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i> 、 <i>Cna</i>	3	4.11
	<i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>Cna</i>	1	1.37
	<i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i> 、 <i>Cna</i>	1	1.37
	<i>icaA</i> 、 <i>icaD</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i>	1	1.37
6	<i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i> 、 <i>Cna</i>	15	20.55
	<i>icaA</i> 、 <i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i>	9	12.33
	<i>icaA</i> 、 <i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>Cna</i>	1	1.37
7	<i>icaA</i> 、 <i>icaD</i> 、 <i>clfA</i> 、 <i>clfB</i> 、 <i>fnbA</i> 、 <i>fnbB</i> 、 <i>Cna</i>	11	15.07

表 6 73 株金黄色葡萄球菌 MLST 分型分析

Table 6 MLST typing analysis of 73 strains of *S. aureus*

ST 型	菌株数	总占比/%	克隆群	ST 型	菌株数	总占比/%	克隆群
1	4	5.48	CC1	398	6	8.22	-
5	1	1.37	CC5	1659	1	1.37	CC15
6	3	4.11	CC5	2139	1	1.37	-
7	1	1.37	-	5730	1	1.37	-
8	1	1.37	CC8	6697	1	1.37	-
9	1	1.37	-	6770	1	1.37	-
15	8	10.96	CC15	6771	1	1.37	-
22	1	1.37	CC22	6782	1	1.37	-
25	2	2.74	-	6775	1	1.37	CC1
59	2	2.74	-	6781	1	1.37	-
88	9	12.33	-	6772	1	1.37	-
188	10	13.70	CC1	6990	1	1.37	-
199	1	1.37	CC15	未分型	11	15.07	-
338	1	1.37	-				

注：- 表示该 ST 型无克隆群。

表 7 不同季节分离株 MLST 分型情况

Table 7 Types of MLST isolates in different seasons

季节	ST 型	菌株数/型	占比/%
夏季	ST1、ST398、ST88	4	10.81
	ST188	2	5.41
	ST25	2	5.41
	ST5、ST6、ST7、ST8、ST9、ST15、ST22、ST59、ST5730、ST6697、ST6770、 ST6771、ST6781、ST6772、ST6990	1	2.70
冬季	ST188	8	22.22
	ST15	7	19.44
	ST88	5	13.89
	ST6、ST398	2	5.56
	ST59、ST199、ST338、ST1659、ST2139、ST6782、ST6775	1	2.78

ST188、ST15、ST88、ST6、ST398。两个季节的优势ST型数量一致,冬季优势ST型涵盖的菌株数量明显多于夏季,而夏季分离株的ST型明显多于冬季。值得注意的是ST398、ST88、ST188在两个季节中均为优势ST型。

7个新的ST中,ST6770、ST6771、ST6781、ST6772、ST6990在夏季分离株中被检出,ST6782、ST6775在冬季分离株中被检出。

**2.5.2 不同季节分离株克隆群分析** 对金黄色葡萄球菌进行MLST分型后,可得到分离株的克隆群,食品中最常见的克隆群包括CC5,所含菌株有较强的致病性。本研究中,夏季共计5种克隆群,CC1和CC5是优势克隆群;冬季共计3种克隆群,CC15、CC1所含菌株数较CC5多。

## 2.6 基于goeBURST算法的进化分析

对73株分离株的26个ST进行分组和聚类,在SLV=1的条件下,分为5个BGs(BG1、BG2、BG3、BG4、BG5)和8个单体,5个BGs共含有42株菌。BG3以ST2139首要奠基者(Primary founder),包括5种ST型,17株菌,其中7株夏季分离株,10株冬季分离株;BG4以ST15首要奠基者,包括4种ST型,11株菌,其中夏季分离株仅占1株,冬季分离株有10株,4个ST型可能由ST15演化而来;BG5以ST398首要奠基者,包括3种ST型,8株菌,夏季分离株占6株,冬季分离株占2株;BG1和BG2分别以ST5730和ST59为奠基者,均包括3种ST型和3株夏季分离株。

总体上,BG1和BG2全部为夏季分离株,BG3两个季节分离株差异不大,BG4以冬季分离株为主,BG5以夏季分离株为主(图2)。

## 2.7 分离株遗传进化分析

如图3所示,结果显示,分离株与参考ST型的相关性很强,ST6为代表的3株菌与浙江省凉面分离株的亲缘关系最近,ST88为代表的9株菌与上海市医院从女性皮肤感染伤口拭子分离株的亲缘性最近,ST9为代表的1株菌与河南省猪肉中的分离株亲缘关系最近,而二者的克隆群不同,湖北省健康猪中的ST型与本研究中的ST6990亲缘关系最近,推测猪肉中该ST型的分离株可能直接来自生猪本身。值得注意的是,ST59为代表的2株菌与北京食物中毒分离株的ST型亲缘最近,表

表8 不同季节分离株克隆群分析

Table 8 Clonotype analysis of isolates in different seasons

季节	克隆群	菌株数/型	占比/%
夏季	CC1	6	16.22
	CC5	2	5.41
	CC8、CC22、CC15	1	2.70
冬季	CC15、CC1	9	25.00
	CC5	2	5.56

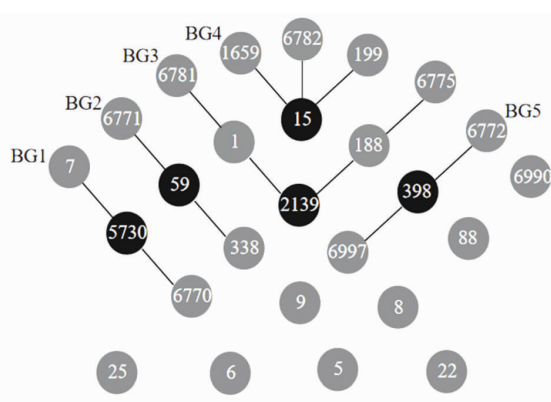


图2 不同季节分离株MLST分型情况

Fig.2 Types of MLST isolates in different seasons

明这两株菌有导致食物中毒的风险,四川牦牛、奶牛乳腺炎中的ST型也与部分菌株有一定的相关性。有研究表明,ST5是我国医院环境中分离率最高ST型之一<sup>[11]</sup>,本研究中ST5与ST188亲缘关系最近,推测ST188可能来源于医院环境,ST5与ST188共分离得到11株菌,这些分离株可能与医院环境有关。

## 3 讨论

刚果红琼脂法测定金黄色葡萄球菌生物膜形成能力的准确性,在国内外部分研究中有一定争议,Knobloch等<sup>[12]</sup>、郭慧琴等<sup>[6]</sup>、钱卫东等<sup>[13]</sup>的研究表明,刚果红琼脂法与96孔微量板法、平板培养法测定结果的相关性不强;而闫兵等<sup>[14]</sup>研究证明,二者得到的结果基本一致。因此,本研究中,利用刚果红琼脂法、96孔微量板法与扫描电镜相结合,从定性、定量到验证的流程进行测定。刚果红琼脂法试验中阳性成膜菌株占84.93%,与Demir等<sup>[1]</sup>从慢性创面感染中分离的金黄色葡萄球菌的

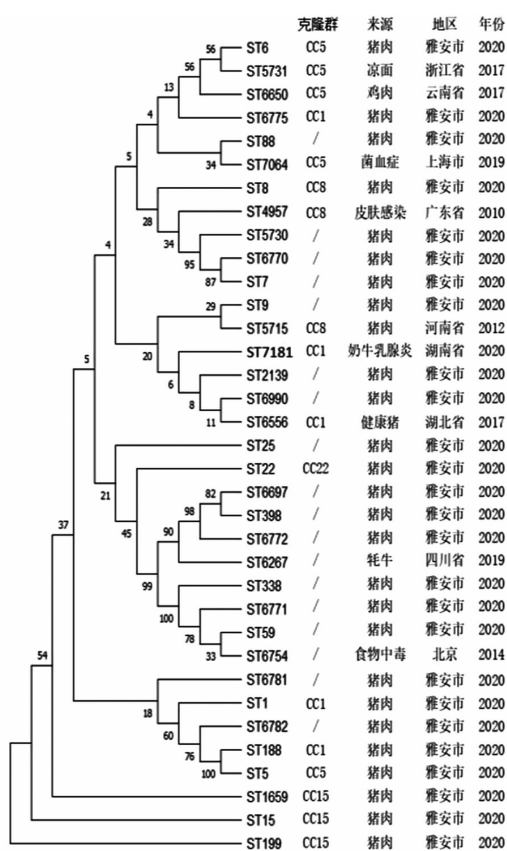


图 3 分离株遗传进化分析

Fig.3 Genetic evolution analysis of isolates

阳性率较为一致(86.61%),而高于陈程等<sup>[15]</sup>从牛乳中分离的金黄色葡萄球菌的黏附率(72%),低于张鹏飞等<sup>[16]</sup>的黏附率(95.45%),可能与菌株来源以及试验误差有一定关系。96孔微量板定量检测法中,强、中、弱成膜能力的菌株占比为94.52%,与刚果红法在数据上有一定差异,这与刚果红法结果的低重现性和96孔微量板法洗板力度有较大关系。通过扫描电镜观察发现,不同黏附能力的菌株确实在钢板上形成了不同程度的聚集,因此前两种方法在一定程度上能够起到对菌株的前期筛选作用,而笔者认为在用专业的洗板机冲洗96孔板的条件下,96孔微量板法更准确。此外,培养温度、时间、状态、培养基组成等均是影响其成膜率的重要因素。Thiran等<sup>[17]</sup>将不同菌株接种在聚苯乙烯组织培养板上,不同温度(37, 20℃)培养不同时间(24, 48, 72h)发现,37℃培养24h后,54%的菌株无法产生被膜,20℃培养48h和72h后均有

70.80%的菌株无法产生被膜,同时该研究还表明,在动态培养条件下更有利于被膜的形成;Lade等<sup>[18]</sup>发现添加1.0%葡萄糖的TSB更利于金黄色葡萄球菌生物膜形成的生长和试验结果的重现,而添加氯化钠的培养基导致生物膜形成的测量结果有很大差异。

在成膜基因和黏附基因PCR试验中,成膜基因*icaA*、*icaD*和*bap*的检出率分别为30.14%、93.15%和0,其中,*bap*基因的检出率与Chen等<sup>[19]</sup>和马伊萨兰等<sup>[20]</sup>的研究结果一致,而*icaA*、*icaD*的检出率低于Demir等<sup>[1]</sup>从创面分离得到的菌株检出率,这可能是创面分离株的致病性更强导致相应基因的检出率较高。Pereyra等<sup>[21]</sup>研究证明,*icaA*、*icaD*的高检出率与生物膜的形成有必然关系。在本研究中,*icaA*的检出率低,有5.48%(4/73)的菌株在刚果红琼脂平板和96孔板培养中均为生物膜阳性,而*icaA*和*icaD*基因未检出,一种原因是依赖于*icaB*和*icaC*形成被膜,另一种原因是*ica*非依赖性生物膜的调控系统所致,涉及双组分系统(Tcs)和转录及转录后调节因子,包括RNA分子<sup>[22]</sup>,同时其黏附基因也是一个重要因素。纤维连接蛋白结合蛋白基因*fnbA*和*fnbB*的检出率为100%和95.89%,主要介导金黄色葡萄球菌与纤维蛋白原、弹性蛋白和纤维连接蛋白的黏附;针对生鲜猪肉中*clfA*、*clfB*基因的研究极少,在本研究中其检出率为86.30%和100%。

在MLST分型试验中,ST188、ST88、ST15、ST398的检出率最高,26个ST型分为5个BGs, BG1和BG2全部为夏季分离株,然而由于二者涵盖的菌株数较少,因此代表性并不强;BG4和BG5涵盖的菌株较多,至于BG4以冬季分离株为主, BG5以夏季分离株为主的原因有待进一步探究。在系统发育树分析中,部分分离株与食源性、医源性、动物源性的分离株的相关性很大,存在即食食品中分离株与猪肉交叉污染,致病性强的菌血症分离株,以及食物中毒菌株与猪肉交叉污染,生鲜猪肉中的分离株有直接来自生猪的可能。研究表明,金黄色葡萄球菌通过水平基因转移方式获得耐药、定植和感染相关因子,可能是某一克隆株能成功流行的重要原因,细菌遗传背景、外部条件等都会影响克隆群流行传播<sup>[23-24]</sup>。同时,本研究

部分 ST 型与参考 ST 型亲缘关系较远,原因可能与笔者选择的参考 ST 型有关,或二者的亲缘关系本身就较远。

### 参 考 文 献

- [1] DEMIR C, DEMIRCI M, YIGIN A, et al. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns [J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2020, 29: 101584.
- [2] BAZARI P A M, JAHROMY S H, KARIZI S Z. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens, an atomic force microscopic (AFM) study [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 533-539.
- [3] REN Q, LIAO G, WU Z, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(4): 3368-3380.
- [4] 王琦, 宋衍燕. 金黄色葡萄球菌肠毒素与多位点序列分型分子分型研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4714-4720.  
WANG Q, SONG Y Y. Research progress of *Staphylococcus aureus* enterotoxin and multilocus sequence typing molecular typing[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(12): 4714-4720.
- [5] 吴任之, 张翼, 刘柳, 等. 生鲜猪肉中金黄色葡萄球菌的耐药特征、毒力基因及 agr 分型[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(1): 34-42.  
WU R Z, ZHANG Y, LIU L, et al. Resistance characteristics, virulence genes and agr typing of *Staphylococcus aureus* in fresh pork [J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(1): 34-42.
- [6] 郭慧琴, 李田, 肖鹏, 等. 牛源金黄色葡萄球菌的分离鉴定、耐药性分析及木糖醇对生物膜形成的干预[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(5): 889-893.  
GUO H Q, LI T, XIAO P, et al. Isolation, identification and bacterial resistance of dairy cows' *Staphylococcus aureus* and intervention of biofilm formation by xylitol[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(5): 889-893.
- [7] 回丽媛, 李军, 朱明星, 等. 抗菌肽 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 872-880.  
HUI L Y, LI J, ZHU M X, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by antimicrobial peptide 17BIPHE2 [J]. Microbiology, 2017, 44(4): 872-880.
- [8] WANG W, LIN X, JIANG T, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1123.
- [9] 张阳. 猪源金黄色葡萄球菌的毒力基因分布, 生物膜形成和凝血致病性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
ZHANG Y. The Distribution of virulence genes, biofilm formation and coagulation pathogenicity of porcine *Staphylococcus aureus* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [10] 陈秋云, 韩北忠, 李春雷. 金黄色葡萄球菌生物膜在不锈钢表面的形成及其对二氧化氯的敏感性[J]. 中国农业大学学报, 2004(4): 10-13.  
CHEN Q Y, HAN B Z, LI C L. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on stainless steel surface and its sensitivity to chloride dioxide [J]. Journal of China Agricultural University, 2004(4): 10-13.
- [11] 朱元军, 李天铭, 王亚楠, 等. 社区获得性金黄色葡萄球菌 ST398 克隆株与医院获得性 ST5、ST239 克隆株毒力及耐药特征[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(4): 295-301.  
ZHU Y J, LI T M, WANG Y N, et al. Community-associated *Staphylococcus aureus* ST398 isolates compared with hospital-associated ST5 and ST239 isolates in terms of virulence and antimicrobial resistance [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 15(4): 295-301.
- [12] KNOBLOCH J K, HORSTKOTTE M A, ROHDE H, et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* [J]. Medical Microbiology and Immunology, 2002, 191(2): 101-106.
- [13] 钱卫东, 沈兰芳, 王婷, 等. 金黄色葡萄球菌的耐药性及生物膜形成能力研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 132-139.  
QIAN W D, SHEN L F, WANG T, et al. Drug resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococ-*



- cus aureus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(9): 132–139.
- [14] 闫兵, 潘一鸣, 张昌峰, 等. 临床分离金黄色葡萄球菌生物膜形成、毒性以及耐药性的研究[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(7): 1291–1294.
- YAN B, PAN Y M, ZHANG C F, et al. Biofilm formation, pathogenicity and resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2016, 43(7): 1291–1294.
- [15] 陈程, 张锐, 姜兴佳, 等. 牛乳源金黄色葡萄球菌生物膜形成与耐药性的研究[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(6): 774–781.
- CHEN C, ZHANG R, JIANG X J, et al. Biofilm formation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(6): 774–781.
- [16] 张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的形成及相关基因的检测[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 41–49.
- ZHANG P F, WANG T, ZHONG N, et al. Detection of biofilm formation and biofilm-related genes of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(10): 41–49.
- [17] THIRAN E, DI CICCIO P A, GRABER H U, et al. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(2): 1000–1012.
- [18] LADE H, PARK J H, CHUNG S H, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(11): 1853.
- [19] CHEN Q, XIE S, LOU X, et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources[J]. *Microbiologyopen*, 2020, 9(1): e00946.
- [20] 马伊萨兰, 张荣, 王洪志, 等. 食品中金黄色葡萄球菌生物膜形成基因分析及影响因素研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(15): 129–133.
- MA Y S L, ZHANG R, WANG H Z, et al. Analysis of biofilm formation related genes and its influence factors for *Staphylococcus aureus* food isolates[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(15): 129–133.
- [21] PEREYRA E A, PICECH F, RENNA M S, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 183: 69–77.
- [22] FIGUEIREDO A, FERREI F A, BELTRAME C O, et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(5): 602–620.
- [23] 李敏. 水平基因转移促进 MRSA 的耐药和定植与感染[J]. *中华检验医学杂志*, 2012(8): 690–691.
- LI M. Horizontal gene transfer promotes drug resistance, colonization and infection of MRSA[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2012(8): 690–691.
- [24] KRIEGESKORTE A, PETERS G. Horizontal gene transfer boosts MRSA spreading[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 662–663.

### Detection of Biofilm Capacity and MLST Typing of *Staphylococcus aureus* from Pork

Han Guoquan, Wu Renzhi, Zhang Yi, Rao Junyue, Cao Yunrong, Yang Maojie

(Sichuan Agricultural University Food College, Institute of Food Processing and Safety, Ya'an 625014, Sichuan)

**Abstract** *S. aureus* has a high detection rate in fresh pork, which is one of the main foodborne pathogens that pollute fresh pork, and poses a great threat to food safety and human health. In this study, Congo red Agar method was used to determine the quality, 96-well microplate quantitative analysis combined with scanning electron microscope to detect the film-forming ability, PCR method was used to detect the film-forming genes and adhesion genes. Finally, the isolates were analyzed by multi-site sequence typing (MLST). The results showed that the qualitative test of Congo red Agar method showed that 84.93% (62/73) of the strains were biofilm positive, and the 96-well microplate quantitative test

showed that 94.52% (69/73) of the strains were biofilm positive. Scanning electron microscope showed that the strains with different adhesion ability were enriched in gradient on the steel plate. PCR test found that all the strains contained multiple adhesion genes, which carried *icaD*, *clfA*, *clfB*, *fnbA* and *fnbB* at the same time. The strains of *icaD*, *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*; *icaA*, *icaD*, *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB* and *cna* had the largest number of multiple adhesion genes, which were 30.14% (22/73), 20.55% (15/73) and 15.07% (11/73), respectively. In MLST test, 73 strains were divided into 26 ST types, 20 in summer and 12 in winter. CC1 and CC5 were dominant clones in summer and CC15, CC1 and CC5 were dominant in winter. In the phylogenetic tree, the isolates were correlated with domestic food, iatrogenic and animal isolates, showing genetic diversity. The results can provide a scientific basis for the safety supervision of fresh pork, the transmission and the traceability investigation of *S. aureus*.

**Keywords** pork; *S. aureus*; biofilm; multi-site sequence typing