

DOI:10.13350/j.cjpb.220409

• 论著 •

快速检测田鼠巴贝西虫重组酶介导核酸等温扩增方法的建立^{*}

邵雷¹,赵松²,刘燕红³,叶钰滢²,应清界³,林红^{1**},杨坤^{2**}

(1.江苏省血液中心,江苏南京210042;2.卫生和计划生育委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室,江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室,江苏省血吸虫病防治研究所;3.江苏奇天基因生物有限公司)

【摘要】 目的 建立快速检测田鼠巴贝西虫的重组酶介导核酸等温扩增方法(RAA)。方法 选取田鼠巴贝西虫线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(cox I)序列,设计检测田鼠巴贝西虫的通用引物,并对引物进行筛选和特异性检测,建立并优化田鼠巴贝西虫的重组酶介导核酸等温扩增体系。分别采用重组质粒和田鼠巴贝西虫成虫DNA为模板测试方法的灵敏度;利用其他种类寄生虫DNA,包括输血传播寄生虫评估该方法的特异性并对42例外籍献血者进行田鼠巴贝西虫筛查。结果 筛选出1组扩增效果良好的引物。RAA反应过程在37℃20 min完成,最低可扩增浓度为10⁻¹ copies/μL的重组质粒和浓度为10⁻³ ng/μL的田鼠巴贝西虫基因组。RAA方法具有良好的特异性,与其他寄生虫无交叉阳性反应。应用RAA方法检测42例外籍献血者标本均为阴性。结论 成功建立了一种敏感、特异的检测田鼠巴贝西虫的RAA法,该方法可用于献血者血液筛查时的快速检测以及田野调查时大规模样品检测。

【关键词】 田鼠巴贝西虫;重组酶介导等温扩增;核酸检测

【中图分类号】 R383

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)04-0420-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Apr;17(4):420-424.]

Development of a recombinase aided amplification for detecting *Babesia microti* infection

SHAO Lei¹, ZHAO Song², LIU Yan-hong³, YE Yu-ying², YING Qing-jie³, LIN Hong¹, YANG Kun²

(1. Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, Jiangsu, China 210042; 2. Key Laboratory of National Health and Family Planning Commission on Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases; 3. Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd.)

【Abstract】 **Objective** To establish a recombinase-aided amplification nucleic acid isothermal amplification (RAA) method for the rapid detection of *Babesia microti*. **Methods** The sequence of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (cox I) of *Babesia microti* was selected, and universal primers were designed. The primers were screened and tested for specificity to establish and optimize the RAA system. The sensitivity of the method was tested using recombinant plasmid and adult *Babesia microti* DNA as templates, respectively. The specificity of the method was assessed using other species of parasite DNA, including other transfusion-transmitted parasites. The method was also evaluated to screen 42 blood samples from foreign student blood donors. **Results** One set of primer pairs with good amplification effect was selected. The RAA reaction conditions were optimized at 37℃ for 20 min. The minimum concentration of recombinant plasmid at 10⁻¹ copies/μL and the genome of *Babesia microti* at 10⁻³ ng/μL could be amplified. This method had good specificity and no cross-positive reaction for other parasites. All 42 blood donors' samples were negative. **Conclusion** A sensitive and specific RAA method for the detection of *Babesia microti* was successfully established which can be used for rapid detection during blood screening and for the detection of large-scale samples during field surveys.

【Key words】 *Babesia microti*; recombinase-aided amplification; nucleic acid test

* **巴贝西虫病(abesiosis)是由寄生在红细胞内的巴贝西虫属(Babesia)的原生动物引起的。巴贝西虫常通过硬蜱科(Ixodidae family)被感染的蜱传播^[1],另外也可经受污染的血液制品传播^[2],也有通过胎盘和围产期途径的母婴垂直传播报道^[3]。感染者多无症状,免疫力低下的人和动物表现出严重的临床症状,包括发烧,发冷,疲劳,关节痛头痛甚至死亡^[4]。1957年前南斯拉夫首次报道脾切除术后农民感染了巴贝西

* **【基金项目】** 江苏省科技厅社会发展项目(No. BE2019755);江苏省国际科技合作项目(No. BZ2020003)。

** **【通讯作者】** 林红,E-mail:linhong712003@sina.com
杨坤,E-mail:jipdyk@163.com

【作者简介】 邵雷(1989-),男,安徽淮南人,硕士,主要从事输血相关传染病病原体检测与分子生物学研究。
E-mail:nike8904@163.com
邵雷和赵松为共同第一作者。

虫,成为第一例报道的人类感染巴贝西虫病例^[5]。许多国家,包括美国、澳大利亚、德国、日本和中国,已确诊了更多的巴贝西虫感染者,这也意味着人患巴贝西虫病的风险正在增加^[6]。

巴贝西虫属种类较多,其中田鼠巴贝西虫(*Babesia microti*)是引起人和啮齿类动物巴贝西虫病的重要和主要的病原体,通过蜱叮咬自然获得的感染在具有免疫力的宿主中通常是轻度甚至亚临床的,但可以导致无症状的携带状态,这种状态可持续数年^[2]。无症状感染者通过输血传播田鼠巴贝西虫给免疫力低下的受血者,可能带来严重甚至致命威胁,因此成为红细胞输血传播感染的主要来源,也是美国食品和药物管理局(FDA)报告的输血相关死亡的主要传染性原因^[7]。2012年美国开始在田鼠巴贝西虫流行地区采用血清学方法检测抗体和定量PCR方法检测巴贝西虫DNA对献血者进行筛查,避免了受感染血液进入血液供应系统,并使得输血传播巴贝西虫在筛查地区降到零^[8]。我国报道的动物感染巴贝西虫比较广泛,但近几年越来越多的地区发现人感染病例^[9],且多为疑似输血感染^[10-12]。巴贝西虫的感染筛查对于了解我国巴贝西虫的流行情况以及正确诊断和有效治疗至关重要。因此亟待研制和开发相应的检测方法以应对这种新发传染病。本研究拟建立等温重组酶介导(recombinase aided amplification, RAA)的核酸扩增方法用于田鼠巴贝西虫的分子检测。

材料与方法

1 材料

健康人全血及42例外籍留学生献血者标本均来自江苏省血液中心合格献血者。田鼠巴贝西虫成虫DNA由中国疾病预防控制中心寄生虫防治所陈家旭实验室提供,其他输血传播寄生虫由江苏省寄生虫病防治研究所提供。血液/组织DNA提取试剂盒购自美国Qiagen公司;Taq DNA聚合酶(5 U/μL),dNTP, MgCl₂ 和 10 × Reaction Buffer 购自上海Takara公司;50×TAE缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司;Agarose琼脂糖粉购自美国MBI公司;2 000 bp DNA分子质量标志物为Takara生物技术(北京)有限公司产品;RAA试剂盒购自江苏奇天基因生物科技有限公司;pMD19-T(Simple)克隆目的基因由生工生物工程(上海)股份有限公司构建。

2 方法

2.1 质粒构建和引物设计 在NCBI数据库中检索田鼠巴贝西虫线粒体细胞色素C氧化酶亚基(cytochrome c oxidase subunit I, cox I)基因全序列(GenBank登录号:LC005813.1),运用DNAMAN7.0软件

进行同源性分析,筛选出高度保守的核酸序列作为RAA检测的靶标。根据RAA技术原理,应用Amplifix软件设计特异性扩增靶序列的上下游引物(引物序列和两两组合后的扩增长度见表1),由上海生工生物有限公司合成,通过RAA反应进行引物对筛选。

表1 RAA引物信息
Table 1 RAA primers designed

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'→3')	引物两两组合 Primers combination		
		引物对 Primer pair	扩增产物 Size (bp)	扩增产物 Primer pair
正向引物 Forward primers	F1:CAGTTACCAACTCTGGTCTATCTATATAAC	F1/R1	239	F1/R2
	F2:CTTGGTCTATCTATATAACATCTGTGTTATTG	F1/R3	184	F2/R1
	F3:TATTGTTAGTAACATTACCAGTGTTAACAG	F2/R2	225	
反向引物 Reward primers	R1:CAGGCTAAGATCAAGCTAATGATAACAAATG	F2/R3	170	F3/R1
	R2:ATACAAAATGCTGGAATATTAGTACATACAC	F3/R2	187	
	R3:CTGGATGTCAAAGACCCAGAACATAGATGCCGA	F3/R3	153	

2.2 基础RAA反应体系建立及反应条件优化 基础RAA反应采用基础RAA试剂盒,按说明书方法操作,总反应体系为50 μL。为确定最佳反应温度和时间,配制基础RAA反应体系后将反应管分别置于36、37、38、39、40 °C水浴锅中,以10³ copies/μL标准质粒为模板进行扩增,分别在20、25和30 min后取出反应管。进行2%琼脂糖凝胶电泳,并根据条带亮度确定最佳反应温度和时间。

2.3 灵敏度检测

2.3.1 以重组质粒为模板检测RAA法的灵敏度 以上述高度保守序列作为检测目的基因,TA克隆入质粒载体,目的片段大小为500 bp,重组质粒转化入大肠埃希菌杆菌(DH5α)培养并提取质粒,采用紫外分光光度计进行浓度测定并进行拷贝数计算,并经梯度稀释得到不同拷贝数的重组质粒,分别为10³、10²、10¹、1、10⁻¹、10⁻²和10⁻³ copies/μL,以此为模板进行基础RAA检测,评价方法的灵敏度。

2.3.2 以田鼠巴贝西虫成虫基因组DNA为模板检测RAA法的灵敏度 提取田鼠巴贝西虫成虫DNA,采用紫外分光光度计测量DNA浓度,用纯水稀释至1 ng/μL,再进行10倍梯度稀释,使DNA浓度分别为10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ ng/μL,各取1 μL模板进行基础RAA检测,评价方法的灵敏度。

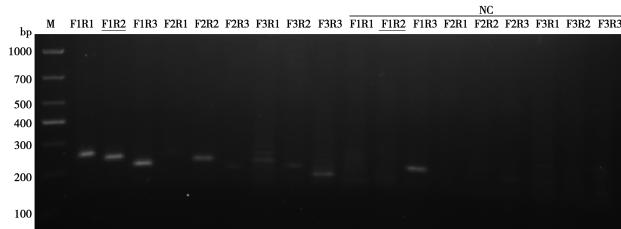
2.4 特异性检测 选择其他输血传播寄生虫,如田鼠巴贝西虫、婴儿利什曼原虫、杜氏利什曼原虫、刚地弓形虫、间日疟原虫、恶性疟原虫、三日疟原虫和卵形疟原虫以及溶组织阿米巴虫、犬吉氏巴贝西虫等其他寄

生虫 DNA 作为模板,以田鼠巴贝西虫 DNA 为阳性对照进行基础 RAA 反应。同时对 42 例外籍献血者标本进行田鼠巴贝西虫感染筛查,以健康献血者全血 DNA 为模板作为空白对照,进行临床标本的验证。

结 果

1 质粒构建和引物筛选

两两组合的 9 对引物 RAA 反应结果如图 1。其中第 2 对引物(F1/R2)利用 10^3 copies/ μL 的质粒作为模板进行扩增,扩增产物条带清晰、单一,且阴性对照无扩增。表明该对引物扩增效率高,特异性良好,由此确定该对引物对为最佳。利用此引物进行标准质粒的扩增,得到约 218 bp 的目的片段,与预期产物大小一致。将扩增产物一代测序结果和质粒已知插入序列进行比对,结果一致。该引物对和质粒用于后续试验。



注:各对引物对均采用 10^3 copies/ μL 重组质粒和阴性对照(NC)作为模板进行扩增。

图 1 不同引物组合的 RAA 结果

Notes: Each primer pair uses 10^3 copies/ μL recombinant plasmid and negative control (NC) as a template for amplification.

Fig. 1 RAA results by different primer combinations

2 RAA 条件优化

将反应时间设置为 20、25、30 min 进行 RAA,结果如图 2。37 °C、浓度为 10^3 copies/ μL 的质粒均有扩增,阴性对照均无扩增。但以 20 min 时条带更清晰,故选择 20 min 作为 RAA 最佳反应时间(图 2A)。

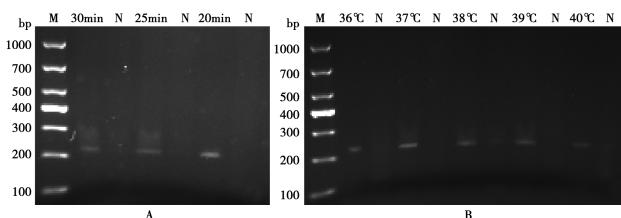


图 2 RAA 反应时间和温度优化

Fig. 2 Optimization results of reaction time and temperature of RAA

将反应温度设置为 36~40 °C 进行 RAA,结果如图 3。当反应时间为 20 min 时,5 个温度梯度均可检测到扩增产物。反应温度为 36、38、40 °C 时阴性对照有较淡的扩增条带,而反应温度为 37 °C 时阴性对照无扩增条带且比 39 °C 扩增条带更清晰(图 2B),因此选择 37 °C 作为 RAA 最适反应温度。

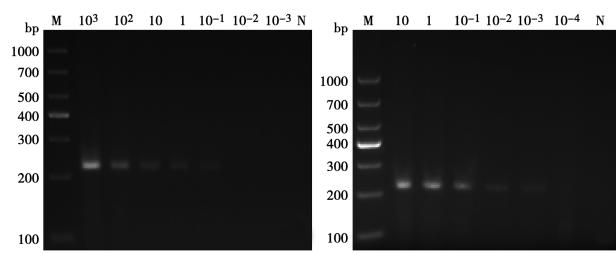


图 3 RAA 的灵敏度检测

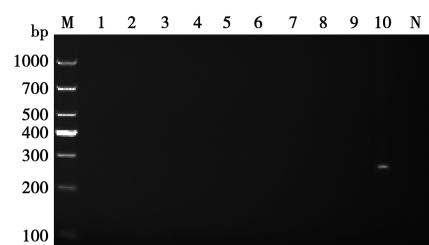
Fig. 3 Sensitivity results of RAA

3 RAA 的灵敏度

以含有田鼠巴贝西虫 cox1 片段的合成质粒 DNA 为模板进行 RAA 灵敏度检测,结果如图 3A。RAA 最低可检测到 10^{-1} copies/ μL 的质粒 DNA,阴性对照无扩增。将田鼠巴贝西虫基因组进行 10 倍梯度稀释至 10^{-4} ng/ μL 进行 RAA,能扩增的田鼠巴贝西虫基因组有效浓度为 10^{-3} ng/ μL ,阴性对照无扩增(图 3B)。

4 RAA 的特异性

提取其他 9 种寄生虫的核酸进行 RAA 特异性验证试验,只有田鼠巴贝西虫出现特异性扩增反应,其余均为阴性(图 4)。表明此体系不与其他输血传播寄生虫出现交叉反应,特异性良好。42 例外籍献血者标本 RAA 反应均阴性(图 5)。



M DNA 标志物 1~10 分别为犬吉氏巴贝西虫,刚地弓形虫,婴儿利士曼原虫,杜氏利士曼原虫,溶组织阿米巴虫,间日疟原虫,恶性疟原虫,三日疟原虫,卵形疟原虫和田鼠巴贝虫基因组扩增 N 阴性对照

图 4 RAA 特异性检测

M DNA molecular quality marker 1-10 The result of genome amplification of *B. guisi*, *T. gondii*, *L. infantile*, *L. durandii*, *A. histolytica*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* and *B. microti*, respectively N Negative control

Fig. 4 Specificity results of RAA

讨 论

目前关于我国人群巴贝西虫病流行率的调查报告尚少^[13-16],已报道的巴贝西虫感染病例^[10-12]均无蜱接触史,高度怀疑为输血传播。献血者中巴贝西虫的流行情况目前已有报道的仅见于广西(2.53%, 48/1900)^[17]、牡丹江市(1.3%, 13/1000)^[18]和江苏省(0.53%, 5/950)^[19]三地,其检测方法各异,只在广西

献血者中检测到寄生虫血症。血液涂片镜检是检测寄生虫感染的“金标准”，已被广泛采用。但是，该方法需要经过专门培训的有经验人员，并且灵敏度较低，很难直接观察到低于0.1%至0.5%的寄生虫血症，限制了其在巴贝西虫感染无症状者虫体密度较低状态时的使用。更为重要的是田鼠巴贝西虫与恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)极为相似，容易误判^[20]。由于慢性感染并不总是出现可观察到的寄生虫水平，所以，血清学检测目前通常采用间接免疫荧光法(IFA)，通过测定抗体滴度可判断巴贝西虫的感染情况^[21]。但IFA由人工判定，费时费力，用于大规模的筛查常采用混样检测。鉴于潜在的背景反应和解释中的主观性，还存在假阳性的可能。因此，开发分子生物学诊断方法成为筛查巴贝西虫的趋势。

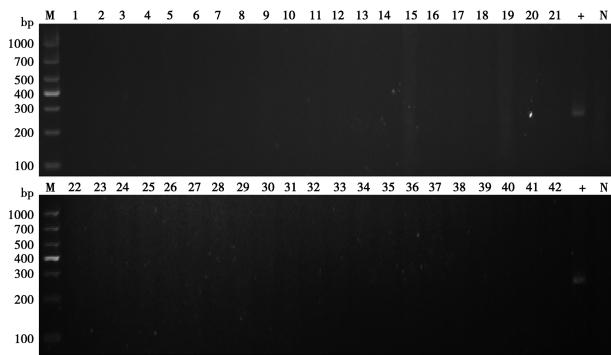


图5 RAA检测42例留学生献血者血液标本结果
Fig. 5 Results of blood samples from 42 foreign blood donors

Teal等^[22]报道了基于田鼠巴贝西虫的18S rRNA基因的实时定量PCR分析，Tonnetti等^[23]报道了靶向巴贝西虫属的核糖体RNA(rRNA)基因的TMA方法，两者的检测限分别为66 parasites/mL和1.8(单个样品)~3.1(16样品混样)parasites/mL。这两种方法已被FDA批准用于献血者血液巴贝西虫筛查。该方法准确灵敏，弥补了显微镜检查和IFA的不足。但由于需要复杂且昂贵的PCR扩增仪器和相配套的试剂来实现核酸扩增，因此限制了其在采血现场的应用。并且由于其扩增时间长和费用高，因此即使在美国也只在巴贝西虫流行区用于献血者筛查。

本研究中的RAA方法采用来自于大肠埃希菌杆菌的recA重组酶，利用其在常温下可与DNA紧密结合的特性，与引物DNA紧密结合，当引物在模板DNA上搜索到与之完全互补的序列时，在单链DNA结合蛋白(SSB)的帮助下使模板DNA解链，并在DNA聚合酶的作用下形成新的DNA互补链^[24]。该扩增过程不需要温度的反复变化，只需要室温37℃左右的条件下5~20 min实现反应产物的指数增长，即使加上琼脂糖凝胶电泳时间，通常在1 h内即可检测

到扩增片段。如果采用荧光定量方法或可视的试纸条方法，最快30 min可得到检测结果。本实验建立的RAA法以田鼠巴贝西虫的cox I基因为靶向目标，以田鼠巴贝西虫的质粒和提取的成虫基因组为模板，在等温条件下扩增出目的基因片段，仅需要20 min。

本方法与PCR法相比操作简单，为田鼠巴贝西虫的筛查诊断提供了一种新型方法。该方法以重组质粒为模板，检测灵敏度为10 copies/μL(0.5~1 parasites/μL)，优于杨亚闪等^[18]建立的靶向18S rRNA荧光定量PCR(20 copies/μL)方法。本实验建立的RAA法以田鼠成虫基因组为模板的检测敏感性为10⁻³ ng/μL。王华素等^[17]以巴贝西虫属18S rRNA为靶点的巢式PCR可扩增最低浓度为2.048×10⁻⁸ ng/μL的巴贝西虫DNA。同样采用等温条件，环介导等温扩增(LAMP)法靶向田鼠巴贝西虫细胞色素B基因(cytB)的检测限可达0.678 fg/μL(=6.78×10⁻⁵ ng/μL)^[25]。聚合酶介导的核酸扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)结合可视化侧流层试纸条方法靶向cox I，扩增巴贝西虫的灵敏度可达0.25 parasites/μL^[26]。说明不同靶向的核酸扩增方法的灵敏度有很大差异，因此可考虑采用不同的靶标建立RAA方法进行灵敏度比较。

另外，本研究建立的RAA方法均获得特异性基因片段，而以其他输血传播寄生虫提取的基因组DNA为模板的扩增结果均为阴性，表明该方法具有高特异性，避免了在显微镜下与疟原虫难以区分导致的误判和误诊。

本研究研发的RAA技术不依赖PCR仪，反应快速且操作简便，作为快速、恒温、灵敏度高和特异性强的检测方法，若采用免核酸提取扩增并结合可视化方法，减少全流程检测时间，采用肉眼观察结果，可用于田鼠巴贝西虫感染筛查。

【参考文献】

- [1] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(11): 1219-1237.
- [2] Leiby DA. Transfusion-transmitted Babesia spp.: bull's-eye on Babesia microti [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(1): 14-28.
- [3] Handel AS, Krugman J, Hymes S, et al. A case of relapsed vertically transmitted babesiosis [J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2021, 10(3): 386-388.
- [4] Krause PJ. Human babesiosis [J]. Int J Parasitol, 2019, 49(2): 165-174.
- [5] Skrabalov Z, Deanovic Z. Piroplasmosis in man; report of a case [J]. Doc Med Geogr Trop, 1957, 9(1): 11-16.
- [6] Lobo CA, Singh M, Rodriguez M. Human babesiosis: recent advances and future challenges [J]. Curr Opin Hematol, 2020, 27(6): 399-405.

- [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, Deistung 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.巴贝西虫实时荧光PCR检测方法初步建立及牡丹江市无偿献血者中巴贝西虫流行情况调查[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.

(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 mecaA-negative community-associated methicillin-resistant strain isolated from a healthy carrier[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019 (17): 260-262.
 - [13] 刘文字, 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