论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409203

重复序列致 *agrC* 突变对金黄色葡萄球菌致病性的影响

饶 青[1],尚伟龙[1],周人杰[2],胡启文[1],张晓鹏[1],杨延成[1],胡 珍[1],朱军民[1],饶贤才[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院急救部[2])

[**摘要**] **目的** 探讨金黄色葡萄球菌 XQ 株毒力变异的机制。**方法** 以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为对照,采用动物实验观察临床分离的金葡菌 XQ 株在体外传代后的毒力改变;通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析菌体及培养上清的蛋白谱变化,应用 PCR 进行金葡菌附属调节基因 *agr* 扩增并测序,分析菌株毒力变异的机制,并进一步通过 qRT-PCR 检测 XQ 株 *agr* 调控的毒力因子变化情况。**结果** 动物毒力实验证实 XQ 株的毒力较对照菌 ATCC25923 强,体外传代培养后,XQ 株第 180 代菌株(XQ^{180})的毒力明显下降,SDS-PAGE 分析发现毒力下降的 XQ 株(XQ^{M}株)培养上清的蛋白表达谱较 XQ 株有明显改变,对金葡菌 *agr* 基因进行测序分析发现 XQ^{M}株的 *agrC* 基因第 443 位有一段 188 bp 的序列插入,而该插入序列就是 *agrC* 基因 255 ~ 442 间序列,正是该 188 bp 重复序列导致 AgrC 蛋白的截短型突变,引起新桥株的致病性降低,qRT-PCR 检测结果证实 XQ^{M}株中受 *agr* 调控的毒力基因表达水平显著下降。**结论** 临床分离的金葡菌 XQ 株毒力强,在体外传代中易发生毒力变异,这种变异与重复序列导致的 *agrC* 突变有关。

[**关键词**] 金黄色葡萄球菌;致病性;动物毒力实验;附属调节基因 *agr*;重复序列
[**中图法分类号**] R372; R378.11; R394.3 [**文献标志码**] A

Effect of *agrC* mutant inserted by repeated sequence on pathogenesis of *Staphylococcus aureus*

Rao Qing[1], Shang Weilong[1], Zhou Renjie[2], Hu Qiwen[1], Zhang Xiaopeng[1], Yang Yancheng[1], Hu Zhen[1], Zhu Junmin[1], Rao Xiancai[1] ([1]Department of Microbiology, Chongqing Laboratory of Microbial Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Emergency, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the underlying mechanism of variable virulence in *Staphylococcus aureus* strain XQ. **Methods** After subculturing *in vitro*, the virulence change in clinical isolated stain XQ of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was tested in BALB/c mouse models, and *S. aureus* strain ATCC25923 was used as control. Protein expression profiles in bacterial cells and supernatants were determined by SDS-PAGE analysis. The genes of accessory gene regulator (*agr*) were amplified by PCR and then sequenced, and the expression levels of virulence factor genes controlled by *agr* in XQ and XQM were also determined by quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). **Results** *S. aureus* XQ strain was more virulent than ATCC25923, however, after culturing *in vitro*, the virulence of the 180th generation of XQ strain (XQ^{180}) was significantly decreased, and SDS-PAGE analysis demonstrated that the protein expression patterns in the culture supernatants were different between XQ and the virulence attenuated strain (XQ^{M}). The sequencing results indicated an extra 188 bp repeated sequence was inserted into the 443th of nucleotide *agrC* gene, resulting in a truncated mutant of AgrC protein. What's more, the gene expression levels controlled by *agr* were markedly reduced in XQ^{M} strain. **Conclusion** XQ is a high-virulence strain of *S. aureus*, and prone to virulence variation during cultured *in vitro*. The virulence variation

[**基金项目**] 国家自然科学基金(31270979);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10066,2011jjA10070);教育部留学归国人员启动基金(2013)
[**通信作者**] 饶贤才,电话:(023)68752240,E-mail:raoxiancai@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.081.html(2014-12-05)

of *S. aureus* XQ is associated with the *agrC* mutant caused by a repeated sequence insertion.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; pathogenesis; animal toxicity experiments; accessory gene regulatory system; repeated sequence

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270979), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10066, 2011jjA10070) and the Starting Fund for Personnel Returning from Overseas of Ministry of Education (2013). Corresponding author: Rao Xiancai, Tel: 86-23-68752240, E-mail: raoxiancai@126.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称金葡菌),是一种重要的人畜共患病原菌,可引起侵袭性化脓感染、食物中毒、心包炎等,危害人和动物健康[1-2]。流行病学调查证实,在我国重庆地区,医院临床分离的革兰阳性菌中,葡萄球菌居首位[3]。我国耐药监测网的 12 家医院 2011 年向美国 JMI 实验室提供的 2 278 株医院感染细菌中,金葡菌分离率排第 1 位(占 15.1%,343/2 278)[4]。可见金葡菌感染已成为我国重要的公共卫生问题。

金葡菌的致病性与其产生的多种毒力因子有关,如产生毒素休克综合征毒素-1 可致毒素休克综合征,产生表皮剥脱毒素导致葡萄球菌烫伤样皮肤综合征,分泌肠毒素引起葡萄球菌食物中毒等;此外,金葡菌还可产生溶血素、杀白细胞素、血浆凝固酶等毒力因子参与致病[5-6]。毒力因子是细菌致病的"武器",金葡菌致病性的强弱取决于菌株携带毒力因子的种类和数量。通常认为携带的毒力因子越多,致病性越强,即临床感染中存在一些毒力较强的金葡菌菌株,可引起高致死性疾病[7]。如美国明尼苏达大学医学院 Kravitz 等报道了一种新出现的致死性疾病,称为葡萄球菌性暴发性紫癜,该病患者表现为在呼吸道感染的康复过程中突然发生病情恶化,患者多死于中毒性休克综合征,研究称,在此前 5 年发现的 12 例该病患者中,仅 2 例生存[8]。当然,金葡菌毒力因子的表达受着 sigma 因子、附属调节因子(accessory gene regulator, *agr*)等的严格调控,调控因子的突变将直接影响其下游毒力因子的表达,进而引起菌株的毒力变化。监测金葡菌强致病性菌株的出现和流行,探讨其毒力的变异对控制金葡菌感染具有重要意义。

本课题组前期从我校新桥医院分离到 1 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA),命名为 XQ 株,该菌感染一 17 岁男性少年,患者 10 d 内因严重脓毒症而死亡。XQ 株经分子生物学鉴定为一株 *spa* t159、*agr* Ⅳ、PVL^+、ST121 型金葡菌,动物实验表明其致病性强,但体外传代后菌株毒力明显减弱。本研究采用体外传代、毒力实验、蛋白谱分析、调控基因及毒力因子检测等方法探讨了 XQ 株毒力变异的机制,揭示重复序列引起的 *agrC* 突变是 XQ 株毒力变异的重要原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及实验动物 金葡菌 XQ 株分离自我校新桥医院急救部,ATCC25923 为 MSSA 对照菌,BALB/c 小鼠购自本校实验动物中心,雌性,6~8 周龄(20 g 左右),SPF 级。

1.1.2 培养基及试剂 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soya broth, TSB)、脑心浸液肉汤培养基(brain heart infusion, BHI)、胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxiod 公司;溶葡萄球菌素购自 Sigma 公司;Triton X-100、细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;TriPure 试剂购于罗氏公司;痕量 DNA 降解试剂盒购自 Promega 公司;逆转录试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据已报道的金葡菌 RN4850(*agr* 型别与 XQ 株相同)的 *agr* 基因序列(GenBank accession no. DQ229853),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 及 qRT-PCR 引物,具体序列见表 1。

表 1 PCR 和 qRT-PCR 引物及序列

引物名称	引物序列(5′→3′)	扩增靶标	片段大小(bp)
agrA-L	GAATACACATTAAAGATTGAAGCA	AgrA	1 454
agrA-R	GCCAGCTATACAGTGCATTTG		
agrB-L	TGACCTTTTCCAACATTAGAC	AgrB	1 495
agrB-R	ATTCTTTAGGTATTTCAACTTCG		
agrC-L	ATGACAGTTATCGCCATAGGTA	AgrC	2 514
agrC-R	GCCAGCTATACAGTGCATTTG		
agrD-L	ATGACAGTTATCGCCATAGGTA	AgrD	1 409
agrD-R	CAAGAATAATACCAATACTGCGA		
sigB-L	CTTAATTAAATTAAAAATACCCCTCG	毒力调节 σ^B因子	1 545
sigB-R	CCTATGAGACAAGATGGAACTCGTG		
hla -L	AAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCA	α-溶血素	200
hla -R	TCGAAACATTTGCACCAATAAGG		
hlg -L	TTCGCTTGTATCGCTTGAACCT	δ-溶血素	192
hlg -R	TCATTCGCCACTGAATCAGGTC		
seb-L	TGTATGTATGGTGGTGTAACTGAGC	葡萄球菌肠毒素 B	207
seb-R	AGGCGAGTTGTTAAATTCATAGAGT		
sspA-L	CTACAACTACACCGGAAGCAATAAA	丝氨酸蛋白酶	199
sspA-R	ACAGACAAACAGCAAACACCTAAGA		
RNAⅢ-L	CATGGTTATTAAGTTGGGATGGC	RNAⅢ	188
RNAⅢ-R	GAAGGAGTGATTTCAATGGCACA		
LipA-L	ACACAATGTTAGGGTTCAACGACG	脂酶 A	185
LipA-R	AAGAGTAGACTTCGGGTTGGCTC		
16S rRNA-L	GCTCGTGTCGTGAGATGTTGG	16S rRNA	195
16S rRNA-R	TTTCGCTGCCCTTTGTATTGT		

1.2.2 细菌培养与传代 金葡菌XQ株接种于2 mL LB培养基中,37 ℃培养过夜,次日按1∶100比例接种于2 mL新鲜无菌的LB培养基中,37 ℃振荡培养过夜,重复上述操作传代200次,分别保存每代细菌。金葡菌ATCC25923接种于2 mL LB培养基中,37 ℃培养过夜备用。

1.2.3 动物毒力实验 将XQ株、传代180次XQ株(XQ^{180})、ATCC25923分别按1∶100比例接种于2 mL TSB中,37 ℃培养至对数生长期(约6 h),用无菌生理盐水稀释至D(600)等于1.0(细菌浓度约为1×10^8 CFU/mL),按100 μL/只剂量皮下注射感染BALB/c小鼠,常规条件下养殖,观察小鼠皮肤的溃烂程度;同时按上述方法将菌浓度调至1×10^6 CFU/mL,按100 μL/只剂量尾静脉注射感染小鼠,观察并统计小鼠死亡情况。通过动物毒力实验,将毒力下降的XQ株命名为XQ^M株。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将过夜菌接种于BHI培养基,37 ℃培养至D(600)为0.8,取1.5 mL菌液10 000×g离心1 min,吸取上清1 mL加入100 μL预冷的饱和TCA溶液,冰浴1 h,制备标本,参见文献[9]方法进行SDS-PAGE凝胶电泳,考马斯亮蓝染色并观察[10]。

1.2.5 目标基因的PCR扩增及核酸测序分析 过夜培养XQ株和XQ^M株,次日吸取1 mL菌液,10 000×g离心5 min,采用细菌基因组DNA提取试剂盒分别提取XQ株及XQ^M株的基因组DNA,具体步骤参见细菌基因组提取试剂盒说明书。以提取的细菌基因组DNA为模板,用2×*Taq*酶及相应的引物分别扩增各毒力调节基因,回收PCR扩增片段,送上海立菲生物技术有限公司进行DNA测序,测序结果用BioEdit软件进行比对分析。

1.2.6 qRT-PCR检测毒力因子表达 取过夜培养菌按1∶100比例接种于2 mL无菌BHI中,37 ℃振荡培养至对数生长中期(约6 h),使用TriPure法按试剂盒说明书抽提金葡菌总RNA,利用DNA降解试剂盒进行痕量DNA的去除,再用TaKaRa公司的逆转录试剂盒将RNA逆转录合成cDNA,用各毒力因子的引物进行荧光定量PCR检测。

1.3 统计学分析

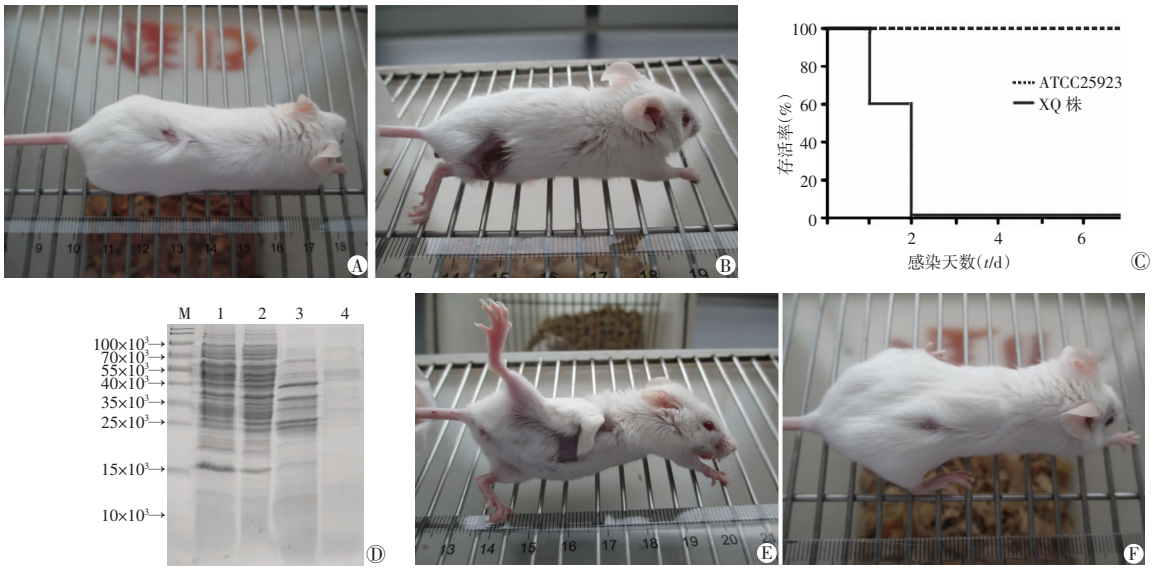
采用SPSS 18.0软件,经独立样本t检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 XQ株毒力实验

以1×10^7 CFU细菌接种小鼠皮下,2周后XQ株感染小鼠的皮肤溃烂程度明显高于对照菌ATCC25923(图1A);1×10^5 CFU细菌经尾静脉感染小鼠,1周内小鼠的存活率如图1B所示,对照菌ATCC25923感染小鼠7 d存活率100%,而XQ株感染组小鼠在第2天即全部死亡,7 d存活率为0%,表明XQ株的毒力较强;分别收集XQ株和ATCC25923的菌体和培养上清,经SDS-PAGE电泳后发现两者的菌体蛋白组成没有明显差异,而在上清中,XQ株的蛋白条带与ATCC25923有显著差异(图1C),表明XQ株的强毒性可能与其分泌的多种毒力因子有关。

为观察XQ的毒力变异,在体外,用LB培养基将XQ株传代培养至200代,用第180代菌株(XQ^{180})进行小鼠毒力实验,结果发现XQ^{180}的毒力明显下降(图1D)。



A、B:分别为相同剂量的XQ株及ATCC25923感染小鼠2周后的伤口情况;C:1×10^5 CFU金葡菌经尾静脉感染小鼠的存活率;D:XQ株和ATCC25923菌体及培养上清的SDS-PAGE电泳结果,1:XQ菌体,2:ATCC25923菌体,3:XQ培养上清,4:ATCC25923培养上清;E、F:分别为相同剂量的XQ株及XQ^{180}株感染小鼠2周后的伤口情况

图1 金葡菌XQ株及其体外传代株毒力实验

2.2 XQ 株连续传代后培养上清的 SDS-PAGE 电泳分析

为探索传代菌株分泌毒力因子的变化，将每传 20 代的菌株培养上清进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果见图 2，可见第 20 代菌株培养上清中的蛋白谱较野生株有很大差异，而 20 ~ 200 代菌株上清的蛋白谱没有明显改变，表明 XQ 的毒力变化在 20 代之前已经发生。

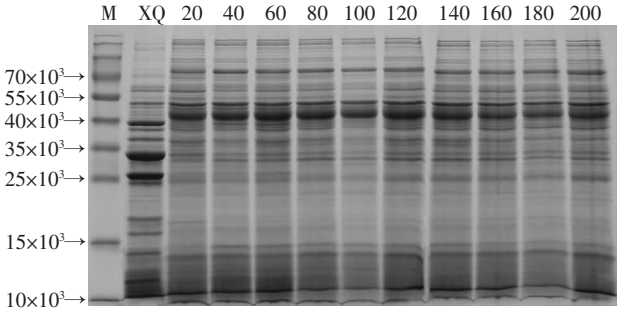
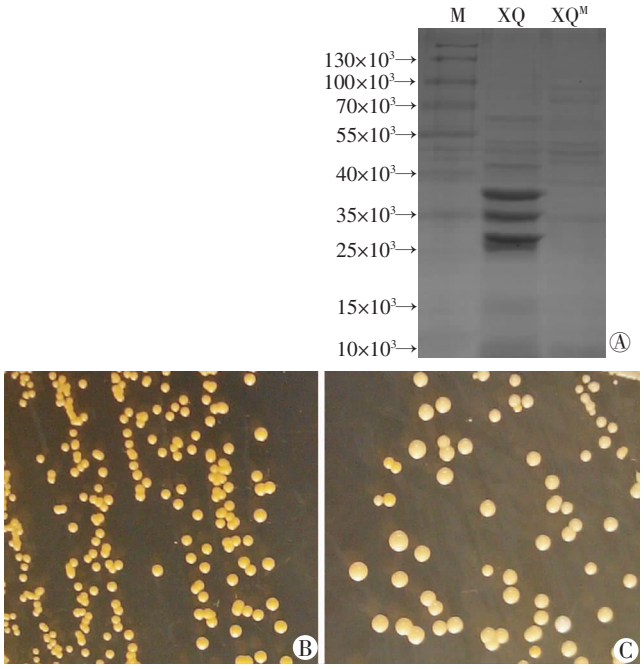


图 2 XQ 株每隔 20 代培养上清的 SDS-PAGE 电泳结果

2.3 毒力变异的 XQ^M 株

对 XQ 株的 1 ~ 20 代培养上清进行 SDS-PAGE 分析，发现传至第 5 代，其上清中的蛋白表达谱即发生改变，毒力下降，将其命名为 XQ^M（图 3A）。在 TSB 琼脂平板上，XQ^M 株生长较快、菌落较大，呈淡黄色，而野生 XQ 株菌落较小，呈金黄色（图 3B）。

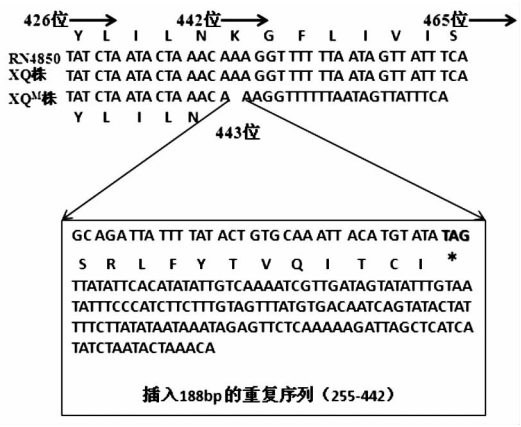


A：XQ 株与 XQ^M 株培养上清蛋白 SDS-PAGE 电泳结果；B、C：分别为 XQ 株与 XQ^M 株菌落形态

图 3 XQ^M 株与 XQ 株的培养上清蛋白 SDS-PAGE 电泳结果及菌落形态观察

2.4 重复序列导致 XQ^M 株 *agrC* 突变

通过对 XQ 株及 XQ^M 株 sigB（编码 sigma 因子 B）、*agrA*、*agrB*、*agrC* 及 *agrD* 等毒力调控基因的 PCR 扩增及核酸测序分析，发现两者的 *sigB*、*agrA*、*agrB* 及 *agrD* 序列相同，而 XQ^M 株的 *agrC* 基因第 443 位被一段 188 bp 序列插入，该插入序列为 *agrC* 基因第 255 ~ 442 间的序列，且为正向插入，即自身序列重复插入导致 AgrC 蛋白的截短型突变（图 4），这种突变可能是 XQ^M 株毒力下降的重要原因。XQ^M 株在体外用 TSB 传代 20 次，对传代后的菌株之 *agrC* 基因进行了重新扩增和测序，发现 188 bp 的插入序列依然存在，表明 XQ^M 株具有遗传稳定性。

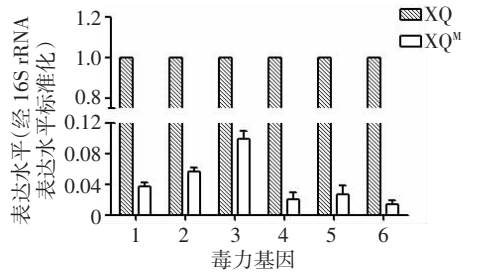


XQ^M 株的 *agrC* 基因第 443 位插入一段 188 bp 的序列，该插入序列为 *agrC* 基因的第 255 ~ 442 之间的序列；RN4850 和 XQ 株的 *agrC* 基因全长为 1 293 bp，编码 430aa，蛋白质理论相对分子质量为 49.7×10^3；XQ^M 株 *agrC* 基因由于重复序列的插入导致蛋白质翻译提前终止，只编码 159aa，产生一个截短型蛋白，蛋白质理论相对分子质量为 18.5×10^3

图 4 金葡菌 *agrC* 基因的重复序列插入突变

2.5 *agrC* 突变导致 XQ^M 株毒力因子表达降低

Agr 作为金葡菌毒力的重要调控系统，其组分 AgrC 的突变可能引起 Agr 调控靶基因表达水平下降。我们采用 qRT-PCR 检测了 RNA Ⅲ、α-溶血素、γ-溶血素、肠毒素 B、脂酶等毒力基因的表达情况，以 16S rRNA 基因的检测结果为内参，将 XQ 株各毒力基因的表达水平进行标准化，即在同一份标本中，用毒力基因表达量/16S rRNA 基因表达量，将得到的比值量化为 1，再计算 XQ^M 中各毒力基因表达量与 16S rRNA 基因表达量的比值，进行量化后的结果如图 5 所示，将两株菌毒力基因的相对表达量进行统计学分析，结果显示 XQ 株和 XQ^M 受 *agr* 调控的各毒力基因表达水平差异显著（$P < 0.01$）。表明 XQ^M 的致病性降低与其 Agr 调控的多种毒力因子表达水平显著下降有关。



1:RNAⅢ;2:α-溶血素;3:γ-溶血素;4:葡萄球菌肠毒素B;5:丝氨酸蛋白酶;6:脂酶A

图5 qRT-PCR检测金葡菌XQ株和XQ^M株毒力因子编码基因结果

3 讨论

金葡菌是一种重要的社区获得性和医院获得性感染病原菌,可产生50多种毒力因子,引起人类的多种疾病[11-12]。通常金葡菌携带的毒力基因种类和数量决定着其致病性的强弱,即临床分离的金葡菌菌株可因携带毒力基因不同而致病性不一,存在强毒株与弱毒株之别。然而,某些菌株即使携带多种毒力基因也并不表示其致病性就一定强,因细菌毒力因子的表达还受着多种调控基因的调控,只有毒力因子表达了才能参与致病。细菌的毒力调控系统是复杂的,且往往形成网络式调控。如1984年在金葡菌中发现了全局性的附属调节系统*agr*[13],该系统由P2和P3两个操纵子组成,控制RNAⅡ和RNAⅢ的转录。RNAⅡ包含AgrA、AgrB、AgrC和AgrD 4个开放的阅读框[14]。AgrC和AgrA可构成一个双组分信号转导系统,当AgrC被信号分子激活后,可激活转录效应分子AgrA,反馈式促进P2和P3操纵子的转录[15]。P3操纵子表达的RNAⅢ是一种RNA调节分子,调节70多个基因的表达,包括30多个已知的毒力基因[16]。另外,*sigB*基因编码的σ^B因子通过控制转录因子SarA的表达而参与金葡菌毒力因子的表达调控,SarA可与*agr*系统的AgrA相互作用,协同调节RNAⅢ的表达[17]。这些毒力调控分子的缺失或突变势必会影响金葡菌的致病性。

本课题组前期从一17岁男性脓毒症患者(感染10 d死亡)血液中分离出1株金葡菌(XQ株),经鉴定为*spa* t159、*agr*Ⅳ、PVL^+、ST121型菌株。ST121型金葡菌是一类强致病性菌株,2007年,德国Schefold等[18]首次报道了ST121型金葡菌(*spa*分型为t284)导致1例51岁患者肺、肾等多器官功能衰竭的病例。Conceicao等[19]的研究证实ST121型菌株在欧洲国家主要感染儿童,常引起多种器官的侵袭性损害,致病能力强。XQ株感染的患者所在的重庆地区以金葡菌ST239型为主[9],我国目前尚未见对ST121型金葡菌致病性的研究报道。采用小鼠毒力实验,发现1×10^7 CFU的XQ株感染小鼠2周后,动物创口出现深而宽的溃疡,而对照株ATCC25923已趋于恢复;1×10^5CFU的XQ株经尾静脉注射感染小鼠2 d全部死亡,显示出XQ株的强致病性。有意义的是,将XQ株在体外传代200次,毒力实验证实第180代菌株较野生株毒力显著下降,推测可能是菌株在传代过程中出现了毒力变异,于是对XQ株及其传代菌株培养上清进行SDS-PAGE电泳,发现传至第5代,菌株培养上清蛋白表达谱即发生了明显改变,菌株生长快,呈淡黄色,毒力也明显下降(XQ^M株)。

在对细菌致病性研究中,通常是针对某一毒力因子展开,探索某一种毒力因子的缺失或突变对病原菌致病性的影响。本研究发现,XQ株毒力下降后(变为XQ^M株),其培养上清的多个蛋白因子表达量下降,说明XQ^M株的毒力下降是由一组毒力因子表达下调引起的,即XQ^M株调控毒力因子表达的调控基因可能发生了改变。于是,我们对XQ^M株的*sigB*、*agrA*、*agrB*、*agrC*和*agrD*等金葡菌全局性调控分子基因进行了PCR扩增和核酸测序分析,结果发现XQ^M株*agrC*基因的第443位核苷酸处出现了一188 bp的插入序列,有趣的是该插入序列正好是*agrC*基因255~442 bp间的序列,这种自身序列正向重复插入导致AgrC蛋白的截短型突变,影响了AgrC的激活和功能,进而导致Agr的活性下降,毒力基因表达水平普遍下调,最终使得XQ^M株毒力下降。已有文献报道过,Agr是金黄色葡萄球菌化脓性关节炎诱导和复发的关键决定因素[20],Agr的突变可以减少疾病的发生率和严重程度,Agr的突变也可明显减弱金黄色葡萄球菌的入侵能力[21]。然而,在已报道的Agr突变中,主要是个别位点的点突变;如金葡菌RN4220的*agrA*基因之3′端多插入一个A,可导致移码突变,引起*agr*活性的发挥滞后2~3 h[22]。还有研究发现,金葡菌KSI9051的*agr*操纵子基因469~474位为6个T,当插入1个T后,导致1个截短型AgrC蛋白的产生,影响了菌株的致病性[23]。金葡菌8325-4株的*agrA*基因其124位发生T/A突变后,不能合成完整的AgrC蛋白,会导致毒力因子表达受影响[24]。本研究发现的XQ^M株*agrC*基因被自身重复序列插入而引起的突变尚少见文献报道。在课题研究中,我们也试探性地对XQ株进行重组质粒的转化,试图用基因替换的方法在野生XQ株*agrC*基因中插入本研究发现的188 bp序列,探讨插入序列对菌株毒力的影响,但未获成功,可能金葡菌临床菌株对DNA转化存在多种限制。

总之,本研究通过动物毒力实验证实XQ株为一

ST121 型强致病性金葡菌,此类强致病性金葡菌毒株在我国的出现应引起临床上的高度重视。通过细菌培养上清的 SDS-PAGE 分析,发现 XQ 株的致病性与多种毒力因子的表达有关,在体外传代后,XQ 株易发生毒力变异,变异的 XQ^M 株因 *agrC* 基因被自身重复序列插入引起的突变而致,*agrC* 基因被插入序列突变后,XQ^M 株的多种毒力因子表达下调,是导致 XQ^M 株致病性明显降低的主要原因。至于插入序列致 *agrC* 基因突变的具体机制以及 *agrC* 突变对 XQ^M 株毒力的调控作用还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Harris L G, Richards R G. *Staphylococci* and implant surfaces: a review[J]. Injury, 2006, 37(Suppl 2): S3 - S14.

[2] Parsek M R, Singh P K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 677 - 701.

[3] 路晓钦, 李蓉, 张琳, 等. 重庆地区 10 所医院革兰阳性菌的构成及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(5): 594 - 596.

[4] Jones R N, Castanheira M, Hu B, *et al*. Update of contemporary antimicrobial resistance rates across China: reference esting results for 12 medical centers (2011) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(3): 258 - 266.

[5] 李凡. 徐志凯. 医学微生物学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 91.

[6] 王凤玲, 陈洋, 徐倩, 等. 国内杀白细胞素阳性金黄色葡萄球菌感染的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3): 313 - 314.

[7] Spaulding A R, Satterwhite E A, Lin Y C, *et al*. Comparison of Staphylococcus aureus strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 18.

[8] Kravitz G R, Dries D J, Peterson M L, *et al*. Purpura fulminans due to *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(7): 941 - 947.

[9] 尚伟龙, 胡启文, 胡珍, 等. 重庆地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌主要流行克隆更替的机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 735 - 739.

[10] Burts M L, Williams W A, DeBord K, *et al*. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005,102(4): 1169 - 1174.

[11] Appelbaum P C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(Suppl 1): 16 - 23.

[12] Paterson G K, Harrison E M, Holmes M A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Trends Microbiol, 2014, 22(1): 42 - 47.

[13] Novick R P, Geisinger E. Quorum sensing in *staphylococci* [J]. Annu Rev Genet, 2008, 42: 541 - 564.

[14] Qiu R, Pei W, Zhang L, *et al*. Identification of the putative *staphylococcal AgrB* catalytic residues involving the proteolytic cleavage of *AgrD* to generate autoinducing peptide[J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 16695 - 16704.

[15] Painter K L, Krishna A, Wigneshweraraj S, *et al*. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? [J]. Trends Microbiol, 2014, 22(12): 676 - 685.

[16] George E A, Muir T W. Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent *staphylococci* [J]. Chembiochem, 2007, 8(8): 847 - 855.

[17] Arya R, Princy S A. An insight into pleiotropic regulators Agr and Sar: molecular probes paving the new way for antivirulent therapy[J]. Future Microbiol, 2013, 8(10): 1339 - 1353.

[18] Schefold J C, Esposito F, Storm C, *et al*. Therapy-refractory Panton Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* sepsis with progressive metastatic soft tissue infection: a case report[J]. J Med Case Rep, 2007, 1: 165.

[19] Conceicao T, Aires-de-Sousa M, Pona N, *et al*. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(2): 293 - 297.

[20] Mathews C J, Weston V C, Kingsley G H, *et al*. Future management of septic arthritis [J]. Future Rheumatol, 2008, 3(1): 43 - 50.

[21] Heyer G, Saba S, Adamo R, *et al*. *Staphylococcus aureus agr* and *sarA* functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung[J]. Infect Immun, 2002, 70(1): 127 - 133.

[22] Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of *agr* and failure to translate delta- and alpha-haemolysins[J]. Mol Microbiol, 2006, 59(5): 1519 - 1530.

[23] McNamara P J, Iandolo J J. Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051[J]. J Bacteriol, 1998, 180(10): 2609 - 2615.

[24] Adhikari R P, Arvidson S, Novick R P. A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325 - 4 traP::kan[J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4534 - 4540.

(收稿:2014-09-29;修回:2014-10-15)

(编辑 王 红)