

DOI:10.13350/j.cjpb.220308

• 论著 •

金黄色葡萄球菌脂蛋白 SAOUHSC_02650 生物信息学分析及多克隆抗体的制备^{*}彭斌¹, 谭文甫¹, 何敏¹, 陶鹏飞¹, 李冉辉², 陈斌^{1**}

(1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院创伤骨科, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院病原生物学研究所)

【摘要】 目的 利用生物信息学特性分析金黄色葡萄球菌脂蛋白 SAOUHSC_02650, 并制备其多克隆抗体。方法 从 NCBI 网站获得 SAOUHSC_02650 蛋白的氨基酸序列, 利用生物信息学软件分析该蛋白的二、三级结构、磷酸化位点及抗原性等理化性质。根据 SAOUHSC_02650 基因的 DNA 序列设计特异的 PCR 引物, 以金黄色葡萄球菌 DNA 为模板扩增 SAOUHSC_02650 基因, 将 PCR 产物连接到质粒 pET28a 获得重组质粒 pET28a-SAOUHSC_02650, 将该质粒转化入大肠埃希菌 BL21, IPTG 诱导重组 SAOUHSC_02650 蛋白的表达。利用 Ni²⁺ 亲和层析法纯化 SAOUHSC_02650 蛋白, 免疫小鼠, 获得特异抗血清并测定其效价。结果 SAOUHSC_02650 蛋白共有 209 个氨基酸, 分子质量单位为 23.3 ku, 含有信号肽, 是细菌膜外蛋白。该蛋白二级结构中无规卷曲占 60.29%, α 螺旋占 21.05%, β 折叠占 11.96%, β 转角占 6.70%。预测的三级结构可信度和匹配度较低。SAOUHSC_02650 蛋白含有 16 个磷酸化位点, 固有无序样结构域和 5 个 B 细胞表位。IPTG 诱导重组质粒表达 SAOUHSC_02650 蛋白, 纯化后获得了纯度较高的目的蛋白, 该蛋白能够诱导小鼠分泌特异性抗体。结论 表达、纯化了有较好特异性的金黄色葡萄球菌脂蛋白 SAOUHSC_02650, 并制备了高效价的多克隆抗体。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 脂蛋白; 多克隆抗体; 生物信息学

【中图分类号】 R378.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0288-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):288-292.]

Expression and purification of *Staphylococcus aureus* lipoprotein SAOUHSC_02650 and preparation of polyclonal antibody

PENG Bin¹, TAN Wen-fu¹, HE Min¹, TAO Peng-fei¹, LI Ran-hui², CHEN Bin¹ (1. The second affiliated hospital, Department of Trauma orthopedics, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. Institute of Pathogen Biology, Hengyang Medical School, University of South China)^{***}

【Abstract】 **Objective** To analyze the biological characteristics of *Staphylococcus aureus* lipoprotein SAOUHSC_02650, construct the recombinant plasmid pET28a-SAOUHSC_02650, expresse and purify the target protein, and prepare the specific polyclonal antibody. **Methods** The amino acid sequence of lipoprotein SAOUHSC_02650 was obtained from NCBI website. The physical and chemical properties, transmembrane region, signal peptide, secondary structure, tertiary structure, phosphorylation site, intrinsic disordered domain and the distribution of B cell epitope were analyzed by bioinformatics software. Specific PCR primers were designed accroding to DNA sequences of SAOUHSC_02650 gene to amplify SAOUHSC_02650 DNA with by *S. aureus* genome DNA, the PCR product was connected to plasmid pET28a to construct the recombinant plasmid pET28a-SAOUHSC_02650, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21, and the recombinant SAOUHSC_02650 protein, which was induced by IPTG and purified by Ni²⁺ affinity chromatography to immunize the mice. The specific antisera were obtained and their titer were determined. **Results** SAOUHSC_02650 protein is a extracellular lipoprotein has 209 amino acids, with a molecular weight of 23.3 ku and contains a signal peptide. The content of random coil is as high as 60.29%. The content of α -helix was 21.05%, β -sheet was 11.96% and β -turn was 6.70%. The reliability and matching degree of the predicted tertiary structure are low. SAOUHSC_02650 protein contains 16 phosphorylation sites, intrinsic disordered like domains and multiple B cell epitopes. SAOUHSC_02650 was induced by IPTG and purified with high purity which can induce mice to secrete specific antibodies. **Conclusion** *Staphylococcus aureus* lipoprotein SAOUHSC_02650 was expressed and purified and polyclonal antibody was obtained.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Lipoprotein; Polyclonal antibody; Bioinformatics

* **【基金项目】** 湖南教育厅优秀青年项目(No. 20B507 和 No. 19B496); 衡阳市自然科学基金项目(No. 2020jh042735)。

** **【通讯作者】** 陈斌, E-mail: nobutyout@126.com

【作者简介】 彭斌(1984-), 男, 湖南人, 硕士研究生, 主要从事骨感染临床治疗及基础研究。E-mail: 2006pengbin@163.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种常见的机会致病菌^[1-2]。金黄色葡萄球菌可引起骨髓炎、肺炎和心内膜炎等多种感染性疾病^[3-4]。该菌是导致骨髓炎的主要病原菌之一,骨髓炎患者金黄色葡萄球菌的检出率呈逐年上升趋势^[5-6]。当金黄色葡萄球菌感染骨组织后,破坏患者破骨细胞和成骨细胞之间的平衡,并分泌多种毒力因子^[7]。如不及时治疗,易转变为慢性骨髓炎,反复感染并难以痊愈^[5]。

金黄色葡萄球菌可分泌溶血素、白细胞毒素、酚溶性调节蛋白、表皮分解素和超抗原等多种毒素,且这些毒素参与金黄色葡萄球菌的致病及调控宿主的免疫应答^[8-10]。但金黄色葡萄球菌是否还有其他的毒力因子并不清楚。秦晓彬等^[11]研究报道多种细菌膜外的脂蛋白具有致病能力。SAOUHSC_02650蛋白为金黄色葡萄球菌特有,经与NCBI数据库中的所有蛋白质进行比对,未发现其同源蛋白,且其生物学特性尚不清楚,在NCBI中注释为脂蛋白。本研究利用生物信息学方法分析SAOUHSC_02650蛋白的理化特性,并构建重组质粒pET28a-SAOUHSC_02650,表达和纯化脂蛋白SAOUHSC_02650,免疫小鼠后获得多克隆抗体,为抗金黄色葡萄球菌感染的预防和治疗奠定理论基础。

材料与方法

1 实验材料

1.1 菌种、载体和动物 大肠埃希菌DH5 α 、BL21(DE3)和金黄色葡萄球菌NCTC 8325以及载体pET28a均为本室保存。6~8周龄BALB/c小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 主要试剂 细菌DNA提取试剂盒,DNA回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;PCR聚合酶,T₄DNA连接酶,蛋白分子标记,DNA分子标记,限制性内切酶BamHI和SacI均购自大连宝生物公司;蛋白胨和酵母粉购自英国Oxoid公司;BCA蛋白定量试剂盒购自赛默飞公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司;羊抗鼠的IgG二抗购自美国eBioscience公司。

2 方法

2.1 生物信息学分析 在NCBI中获得金黄色葡萄球菌脂蛋白SAOUHSC_02650的氨基酸序列,使用ProtParam分析脂蛋白SAOUHSC_02650的基本理化性质;利用www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM网站预测蛋白的跨膜结构域;用SignalP 5.0预测蛋白的信号肽;使用NetPhos 3.1 Server网站预测蛋白的磷酸化位点;使用www.pondr.com网站分析蛋白固有无序结构域;使用软件蛋白的二级结构;使用

SWISS-MODEL网站分析蛋白的三级结构;使用www.iedb.org网站预测蛋白的B细胞表位。

2.2 重组质粒pET28a-SAOUHSC_02650的构建 从NCBI中获得SAOUHSC_02650的基因序列,设计DNA引物,由上海生工生物公司合成。上游引物:5'-CCGGATCCATGAAAAGATTAGTTACAGGGTTAC-3'(下划线为BamHI位点),下游引物:5'-GGGAGCTCTTATTGTTGGTAGTTTGGATCAG-3'(下划线为SacI位点)。按照DNA提取试剂盒说明书提取金黄色葡萄球菌DNA,以此为模板PCR扩增SAOUHSC_02650基因片段。使用BamHI和SacI对扩增片段以及pET28a空质粒进行双酶切,利用T₄DNA连接酶相连,转化大肠埃希菌DH5 α ,涂布在含卡那霉素的LB固体培养基中,37℃倒置培养16h。挑取单菌落于LB液体培养基中培养,进行PCR鉴定和测序验证。

2.3 重组SAOUHSC_02650蛋白的表达与纯化 利用42℃热激法将重组质粒pET28a-SAOUHSC_02650转化大肠埃希菌BL21。接种到LB液体培养基,培养到吸光度值为0.6时,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG诱导SAOUHSC_02650蛋白表达。离心收集诱导后的大肠埃希菌,置冰浴中超声破碎,12000r/min离心20min,获得上清液,用Ni²⁺亲和层析柱纯化目的蛋白,使用SDS-PAGE电泳分析,利用多粘菌素B除去内毒素,使用BSA法测定目的蛋白浓度。

2.4 小鼠免疫 将BALB/c小鼠随机分为3组,每组3只,分别为SAOUHSC_02650+弗氏佐剂、弗氏佐剂组和阴性对照(PBS)组。第1次接种时将SAOUHSC_02650蛋白与弗氏完全佐剂按照1:1混合均匀,然后每只小鼠接种30 μ g SAOUHSC_02650蛋白。分别在第2、4周进行加强免疫:将SAOUHSC_02650和弗氏不完全佐剂混匀,接种小鼠,每30 μ g SAOUHSC_02650蛋白。末次免疫后第2个周处死小鼠,取血,分离血清。

2.5 血清抗体ELISA检测 取10 μ g/mL SAOUHSC_02650蛋白加到96孔板,4℃包被过夜。将各组血清作倍比稀释,加入96孔板,100 μ L/孔,37℃温箱,孵育2h,洗涤4次;加入100 μ L适当稀释的羊抗鼠IgG二抗,37℃温箱,孵育1h,洗涤4次;加入显色液显色15min,终止反应,测定A₄₅₀值。

结果

1 SAOUHSC_02650蛋白的基本理化性质

SAOUHSC_02650蛋白在GenBank中的登录号为CP000253.1,共209个氨基酸,分子式

C₉₈₆H₁₅₂₇N₂₉₉O₃₅₆S₃,含有3 171个原子数,理论分子质量单位为23.3 ku,理论等电点为5.86。在280 nm处的消光系数为16 390,吸光系数为0.702。不稳定指数为37.7,表明该蛋白为稳定蛋白质。亲水性平均系数(GRAVY)值为-1.441,总体呈疏水性。

2 SAOUHSC_02650 蛋白的信号肽和跨膜区预测

应用 SignalP 5.0 软件预测 SAOUHSC_02650 蛋白具有信号肽,位于蛋白质的16-18位氨基酸,能够引导 SAOUHSC_02650 蛋白穿过细胞膜(图1A)。TM-HMM 软件分析 SAOUHSC_02650 蛋白无跨膜结构域(图1B),该蛋白位于膜外区。

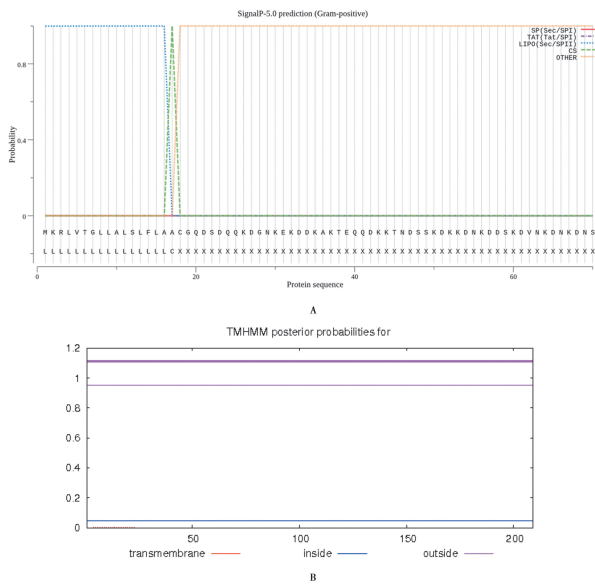


图1 SAOUHSC_02650 蛋白的信号肽(A)和跨膜结构域(B)
Fig.1 Signal peptide(A) and transmembrane domain(B) of SAOUHSC_02650 protein

3 SAOUHSC_02650 蛋白的二、三级结构

采用软件预测 SAOUHSC_02650 蛋白二级结构,其中无规卷曲(C)占60.29%,α螺旋(h)为21.05%,β折叠(e)占11.96%,β转角(t)占6.70%(图2A)。

使用 SWISS-MODEL 预测 SAOUHSC_02650 蛋白的三级结构(图2B),库中与其最为匹配的蛋白是结核分枝杆菌脂蛋白 Rv0603(登录号:2kgy.1.A),但是氨基酸序列只有20.34%相同,预测结果的可信度(GMQE:0.42)和匹配度(QMEAN:0.11)均不理想。



图2 SAOUHSC_02650 蛋白蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)
Fig.2 Secondary structure(A) and tertiary structure(B) of SAOUHSC_02650 protein

4 SAOUHSC_02650 蛋白的磷酸化位点和固有无序结构域

采用 NetPhos 3.1 Server 软件预测 SAOUHSC_02650 蛋白可能有16个磷酸化位点,其中丝氨酸位点有10个,苏氨酸位点2个,酪氨酸位点4个(图3A)。

利用 pondr 软件分析 SAOUHSC_02650 蛋白的25-115位氨基酸为固有无序结构域(图3B)。

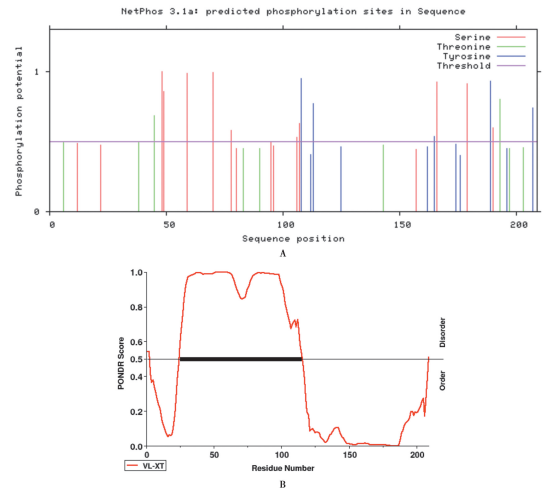


图3 SAOUHSC_02650 蛋白的磷酸化位点(A)和固有无序结构域(B)

Fig.3 Phosphorylation site and intrinsic disordered domain of SAOUHSC_02650 protein

5 SAOUHSC_02650 蛋白的 B 细胞表位

利用 Bepipred 预测 SAOUHSC_02650 蛋白有5个线性 B 细胞表位(具有免疫原性)(图4)。蛋白的氨基酸序列见表1。

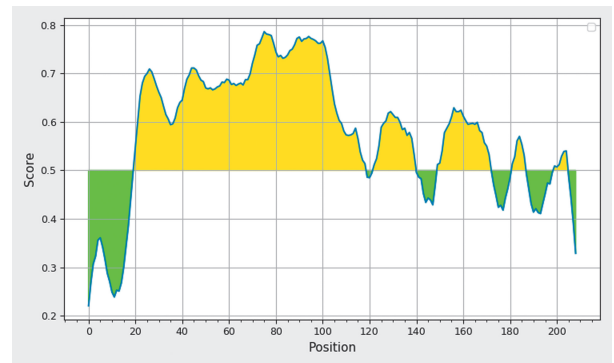


图4 SAOUHSC_02650 蛋白的 B 细胞表位分布

Fig.4 Distribution of B cell epitopes in SAOUHSC_02650 protein

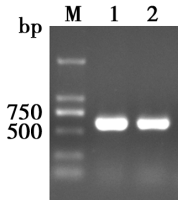
6 SAOUHSC_02650 蛋白的表达与纯化

以 PCR 法鉴定重组质粒 pET28a-SAOUHSC_02650,目的片段大小约630 bp,与 SAOUHSC_02650 基因的理论值相符(图5)。对阳性 pET28a-SAOUHSC_02650 测序,并将测序结果与 NCBI 中的 SAOUHSC_02650 基因序列进行比对,DNA 序列一致,表明成功构建重组质粒 pET28a-SAOUHSC_

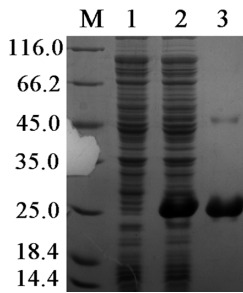
02650。取该质粒转化大肠埃希菌 BL21, IPTG 诱导后获得 SAOUHSC_02650 蛋白, 通过 Ni²⁺ 亲和层析法纯化, 获得高纯度的重组 SAOUHSC_02650 蛋白 (图 6)。

7 SAOUHSC_02650 蛋白多克隆抗体制备

使用 ELISA 检测 SAOUHSC_02650 蛋白末次免疫小鼠血清中特异 IgG 水平, 结果如图 7。SAOUHSC_02650-弗氏佐剂组血清中含有高滴度的特异性 IgG, 佐剂组和 PBS 对照组无特异性抗体 (图 7)。

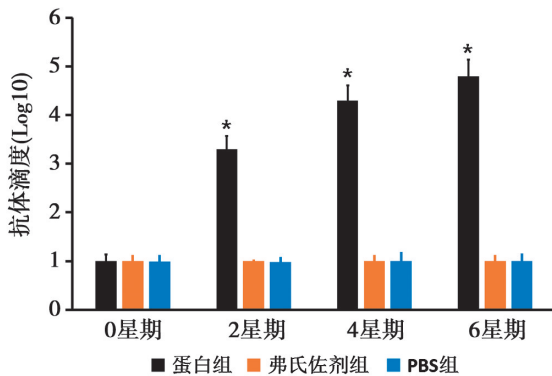


M DNA 标志物 1,2 SAOUHSC_02650 基因 PCR 产物
图 5 重组质粒 pET28a-SAOUHSC_02650 的 PCR 鉴定
M DNAMarker 1,2 PCR product of SAOUHSC_02650 gene
Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pET28a-SAOUHSC_02650 by PCR



M 蛋白分子质量标准 1 空对照 2 未纯化的重组蛋白 3 纯化的重组 SAOUHSC_02650 蛋白
图 6 纯化重组 SAOUHSC_02650 蛋白的 SDS-PAGE 分析
M Protein molecular standard marker 1 Blank control 2 Unpurified recombinant protein 3 Purified recombinant SAOUHSC_02650 protein

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant SAOUHSC_02650 protein



* 与佐剂组和 PBS 组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 免疫小鼠血清中 SAOUHSC_02650 蛋白抗体水平
Fig. 7 Content of specific SAOUHSC_02650 antibody in serum

金黄色葡萄球菌是临床常见的一种条件致病菌, 也是导致骨髓炎的主要病原菌之一。Carlos 等^[12] 研究报道金黄色葡萄球菌定值在骨细胞, 附着在植入物上形成生物膜, 破坏破骨细胞和成骨细胞之间的平衡。由于抗生素治疗由金黄色葡萄球菌引发的骨髓炎效果欠佳^[13], 因此, 亟需寻找金黄色葡萄球菌的毒力因子及解析其致病机制。

金黄色葡萄球菌具有多种毒力因子, 如脂蛋白 MntC 在金黄色葡萄球菌感染早期表达, 参与铁离子的转运, 并具有良好的免疫效果, 能够减轻金黄色葡萄球菌的感染^[14]。目前生产的脂蛋白疫苗伯氏疏螺旋体 OspA 以及脑膜炎球菌 LP2086 分别用于预防莱姆病和脑膜炎球菌病^[15-16]。细菌脂蛋白通常具有信号肽, 定位细菌外膜, 在介导细菌与宿主相互作用中起重要功能。极低浓度的脂蛋白能够通过识别宿主 TLR2 受体, 激活下游的信号通路, 从而诱导细胞因子产生, 同时也刺激宿主免疫细胞活化^[17-18]。多种脂蛋白与细菌的毒力相关, 参与病原菌的黏附、定植、以及免疫逃逸^[11]。本研究利用生物信息学方法分析了金黄色葡萄球菌脂蛋白 SAOUHSC_02650 的生物学特性, 预测结果证实该蛋白含有 209 个氨基酸, 3 171 个原子数, 分子质量单位为 23.3 ku, 理论等电点为 5.86, 不稳定指数为 37.7, 亲水性平均系数 (GRAVY) 值为 -1.441, 具有一个信号肽。表明该蛋白为定位在细胞膜外的稳定的弱酸性小分子蛋白。

通过搜索 NCBI 中的基因数据库, 发现 SAOUHSC_02650 蛋白为金黄色葡萄球菌的特有。预测 SAOUHSC_02650 蛋白的二级结构中的无规卷曲占 60.29%, α 螺旋占 21.05%, β 折叠占 11.96%, β 转角占 6.70%。利用 Ponder 软件分析 SAOUHSC_02650 蛋白具有大量的固有无序结构域。固有无序结构蛋白指的是天然条件下无明确三维结构, 却具有正常生物学功能的蛋白质, 病原菌中的固有无序蛋白与其致病性也密切相关^[19]。本研究预测 SAOUHSC_02650 蛋白的 25-115 位氨基酸为固有无序结构域, 说明该蛋白参与金黄色葡萄球菌的致病性有关。预测 SAOUHSC_02650 蛋白含有多个 B 细胞表位, 并证实重组 SAOUHSC_02650 蛋白具有良好的免疫原性, 能诱导小鼠产生相应抗体。

综上所述, 本研究利用生物信息学分析了金黄色葡萄球菌脂蛋白 SAOUHSC_02650 的生物学特性, 获得了重组质粒 pET28a-SAOUHSC_02650, 并进行了重组 SAOUHSC_02650 蛋白的表达、纯化, 获得了高效价的多克隆抗体, 可为解析金黄色葡萄球菌的致病机制以及疫苗研制奠定了理论基础。

讨论

【参考文献】

[1] Yu SH, Lee JH, Kim MC, et al. Ten-year prevalence trends of phenotypically identified community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in clinical specimens[J]. Ann Lab Med, 2021, 41(4):386-393.

[2] Mitevka E, Wong B, Surewaard BG, et al. The prevalence, risk, and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection in diverse populations across Canada; a systematic review [J]. Pathogens, 2021, 10(4):393.

[3] Ou J, Bassiouni A, Drilling A, et al. The persistence of intracellular *Staphylococcus aureus* in the sinuses: a longitudinal study[J]. Rhinology, 2017, 55(4):305-311.

[4] 徐国超, 关若为, 朱明武, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌院内感染分布及耐药机制研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(4):477-482.

[5] 文强强, 刘岩, 苏子龙, 等. 金黄色葡萄球菌骨髓炎发病机制的研究进展[J]. 实用骨科杂志, 2020, 26(10):901-906.

[6] Jin T, He P, Yang R, et al. CHI3L1 promotes *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis by activating p38/MAPK and smad signaling pathways[J]. Exp Cell Res, 2021, 403(1):470-479.

[7] Li Y, Liu X, Li B, et al. Near-infrared light triggered phototherapy and immunotherapy for elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm infection on bone implant [J]. ACS Nano, 2020, 14(7):8157-8170.

[8] 万佳宏, 常佳伟, 魏彦琴, 等. 金黄色葡萄球菌 Agr 群体感应系统及其抗毒力治疗研究进展[J]. 中国病原生物学杂志 2020, 15(1):115-118.

[9] Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(9):529-543.

[10] 李雅倩, 胡同平. 金黄色葡萄球菌毒力因子的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(17):2712-2717.

[11] 秦小彬, 伍晨露, 彭远义. 细菌脂蛋白功能的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(7):650-656.

[12] Carlos JS, Catherine LW, Desiree RR, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14:e187.

[13] Gimza BD, Cassat JE. Mechanisms of antibiotic failure During *Staphylococcus aureus* osteomyelitis[J]. Front Immunol, 2021, 12(12):e638085.

[14] Ahmadi K, Pouladfar G, Kalani M, et al. Epitope-based immunoinformatics study of a novel Hla-MntC-SACOL0723 fusion protein from *Staphylococcus aureus*: Induction of multi-pattern immune responses[J]. Mol Immunol, 2019, 114(5):88-99.

[15] Phillip K, Nair N, Samanta K, et al. Maternal transfer of neutralizing antibodies to *B. burgdorferi* OspA after oral vaccination of the rodent reservoir [J]. Vaccine, 2021, 39(31):4320-4327.

[16] Martinon-Torres F, Gimenez-Sanchez F, Bernaola-Iturbe E, et al. A randomized, phase 1/2 trial of the safety, tolerability, and immunogenicity of bivalent rLP2086 meningococcal B vaccine in healthy infants [J]. Vaccine Res, 2014, 32(40):5206-5211.

[17] Mohammad M, Na M, Hu Z, et al. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing [J]. Commun Biol, 2021, 4(1):432.

[18] Schmalzer M, Jann NJ, Ferracin F, et al. Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth in vivo [J]. J Immunol, 2009, 182(11):7110-7118.

[19] Halladin DK, Ortega FE, Ng KM, et al. Entropy-driven translocation of disordered proteins through the Gram-positive bacterial cell wall [J]. Nat Microbiol, 2021, 6(8):1055-1065.

【收稿日期】 2021-11-13 【修回日期】 2022-01-05

(上接 287 页)

[18] 诸欣平, 苏川. 人体寄生虫学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018:217.

[19] 管立人, 高春花. 利什曼病及其防治[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(4):418-424.

[20] 张宸罡, 蔡黎. 几种罕见的可能输入性寄生虫病的风险浅析[J]. 上海预防医学, 2018, 30(5):416-420.

[21] Wang JY, Cui G, Chen HT, et al. Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China [J]. Parasites & Vectors, 2012, 5:31.

[22] 周正斌, 李元元, 张仪, 等. 2015-2018 年我国内脏利什曼病疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(3):339-345.

[23] 段秀红. 山西省阳泉市 82 例黑热病病例回顾性调查分析[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(13):2019-2020.

[24] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:102-103.

[25] 岳凤娇, 吕建丽, 张莉, 等. 皮肤利什曼病诊断技术研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6):731-734.

[26] 曾祥嫫, 官亚宜, 伍卫平. 分子生物学技术在利什曼病诊断中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(1):92-96.

[27] 程芳洲, 高春花, 杨玥涛, 等. 我国不同利什曼病流行区利什曼原虫分离株核糖体内转录间隔区 1 的多态性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(2):196-201.

[28] 刘东立, 王凤萍, 王安礼, 等. 陕西株利什曼原虫 ITS-1 基因片段序列多态性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(3):282-286.

[29] 张鹏, 沈兆媛, 张亚萍, 等. 我国内脏利什曼病临床流行病学特征与防治研究现状[J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40(11):703-708.

[30] 杜海娟, 闻礼永, 周晓农, 等. 3 种重要输入性寄生虫病的流行现状及新的挑战[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(4):353-355.

【收稿日期】 2021-11-04 【修回日期】 2022-02-01