

实验技术与方法

VFDB注释法在食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因分型分析中的应用

徐蕾蕊¹,汪琦¹,刘俊²,巴哈提古丽·马那提拜³,邓锐杰⁴,曾静¹,孙震¹

(1. 中国海关科学技术研究中心,北京 100026;2. 成都海关,四川 成都 610041;

3. 乌鲁木齐海关,新疆 乌鲁木齐 830018;4. 四川大学,四川 成都 610042)

摘要:目的 应用VFDB注释法对食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因进行分型并评价其准确性。方法 分别使用VFDB注释法和特异引物PCR方法对2009—2016年从北京地区食品中分离的53株金黄色葡萄球菌的18种肠毒素基因(包括传统肠毒素基因 $sea\sim see$,新型肠毒素基因 $seg\sim sej$ 和类肠毒素基因 $sek\sim seu$)携带情况进行分析。将VFDB注释法所得肠毒素基因序列上传至NCBI,使用BLASTX程序和refseq_protein数据库对注释结果进一步核对。结果 VFDB注释法和PCR方法都检测出53株金黄色葡萄球菌分离株中有45株携带1种或多种肠毒素基因,有8株未携带肠毒素基因,肠毒素基因的总携带率为84.91%(45/53),经典肠毒素基因的携带率为58.49%(31/53)。45株携带肠毒素基因的分离株中,16株菌(35.56%,16/45)肠毒素基因VFDB分型结果与PCR一致,29株菌(64.44%,29/45)的肠毒素基因VFDB分型结果与PCR不一致。经BLASTX核对,VFDB注释法可能误判的基因型包括 $sealsed$ 、 $sealsej$ 、 $sealsep$ 、 sea/ser 、 seg/ser 和 sek/sei (VFDB注释/BLASTX核对)。结论 VFDB注释法可对食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因进行分型分析,但是对注释为 sea 、 seg 和 sek 的序列建议采用BLASTX程序和refseq_protein数据库进一步核对,以提高基因分型的准确性。

关键词:VFDB注释法;金黄色葡萄球菌;肠毒素;基因分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)06-1218-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.014

**Application of VFDB annotation method in genetic subtyping for enterotoxins in foodborne
*Staphylococcus aureus***

XU Leirui¹, WANG Qi¹, LIU Jun², MANATIBAI·Guhatiguli³, DENG Ruijie⁴, ZENG Jing¹, SUN Zhen¹

(1. China Customs Science and Technology Research Center, Beijing 100026, China; 2. Chengdu

Customs, Sichuan Chengdu 610041, China; 3. Urumqi Customs, Xinjiang Urumqi 830018, China;

4. Sichuan University, Sichuan Chengdu 610042, China)

Abstract: Objective To genetically subtype staphylococcal enterotoxins by applying VFDB annotation method and evaluate its accuracy. **Methods** VFDB annotation method and enterotoxin gene-specific PCR were applied to genetically subtype 18 staphylococcal enterotoxins (including traditional enterotoxin genes $sea\sim see$, new enterotoxin genes $seg\sim sej$ and enterotoxin-like genes $sek\sim seu$) in 53 *Staphylococcus aureus* isolated from food in Beijing from 2009 to 2016. All the enterotoxin gene sequences obtained by VFDB annotation method were uploaded to NCBI platform and further verified by BLASTX program and refseq_protein database. **Results** Among the 53 *Staphylococcus aureus* isolates, 45 isolates (84.91%, 45/53) were identified to have one or more enterotoxin genes, and 8 isolates were without enterotoxin genes by both VFDB annotation method and gene-specific PCR. The traditional enterotoxin genes were found in 31 isolates (58.49%, 31/53). Among the 45 isolates which carried enterotoxin genes, 16 isolates (35.56%, 16/45) had consistent enterotoxin gene typing results, and 29 isolates (64.44%, 29/45) had inconsistent results between VFDB annotation methods and PCR method. Compared with BLASTX verified results, genotypes that could be misclassified by VFDB annotation method included $sealsed$, $sealsej$, $sealsep$, sea/ser , seg/ser and sek/sei (VFDB annotation/BLASTX verification). **Conclusion** VFDB

收稿日期:2021-12-30

基金项目:海关总署科研项目(2021HK214)

作者简介:徐蕾蕊 女 高级工程师 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:Lillianxuxu0621@126.com

汪琦 女 高级工程师 研究方向为食品微生物检测 E-mail:wangqi_221@163.com

徐蕾蕊和汪琦为并列第一作者

通信作者:孙震 男 高级工程师 研究方向为实验室检测 E-mail:Sunzhen88@126.com

annotation could be applied as an optional method in predicting staphylococcal enterotoxin genes, but the sequence annotated as *sea*, *seg* and *sek* need to be further verified by BLASTX and refseq_protein database to improve the accuracy.

Key words: VFDB annotation method; *Staphylococcus aureus*; staphylococcal enterotoxin; genotyping

食源性致病菌是引发食物中毒和食品安全事件的重要因素。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,以下简称“金葡菌”)是一种重要的食源性致病菌。在美国,由金葡菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的33%,在加拿大占比高达45%^[1]。在我国由金葡菌引起的食物中毒发生率仅次于沙门氏菌和副溶血弧菌^[2]。金葡菌在适宜条件下可产生金黄色葡萄球菌肠毒素(以下简称“肠毒素”),与金葡菌引起的食物中毒密切相关^[3]。目前,文献中已描述了约24种肠毒素和类肠毒素^[4],其中经典肠毒素是引起金葡菌食物中毒的主要类型,基于抗原差异分为5种类型(*sea~see*)^[5]。此后,研究人员不断从金葡菌中发现新的肠毒素,可将其分为两大类:引起灵长类动物呕吐的新型肠毒素(*seg~sej*),不能引起灵长类动物呕吐的归为类肠毒素(*sek~sex*)^[6]。

对食品中的金葡菌及肠毒素展开监测是我国食品安全监测工作的重点,食品安全国家标准(GB 4789.10—2016)中用酶联免疫吸附方法对5种经典肠毒素进行定性检测^[7]。受制于难以制备单克隆抗体,酶联免疫吸附方法很难满足新型肠毒素和类肠毒素的检测需求。聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)方法是目前金葡菌肠毒素基因检测的主要技术手段^[8],但受引物特异性、DNA模板浓度、扩增条件和扩增抑制剂等因素影响,PCR方法容易出现非特异性扩增和假阴性结果。随着

测序技术的进步,全基因组测序(Whole genome sequencing, WGS)已广泛应用于食品安全领域,对食源性致病微生物的检测溯源、毒力因子分析和耐药性分析具有重要意义^[9]。VFDB(Virulence factors database)数据库是由我国自主研发的致病菌毒力因子数据库和分析平台,目前包含72个菌属(其中32个菌属具有完整信息),11 643个毒力因子,31 913个毒力因子相关基因(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/status.htm>),通过上传基因组数据,与数据库中的毒力因子序列比对,可预测食源性致病菌毒力因子^[10]。

本文通过对2009—2016年北京地区食品中分离鉴定的53株金葡菌进行全基因组测序,应用VFDB注释法对肠毒素基因进行分析,并与PCR检测结果进行比较,旨在评价VFDB注释法对食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因分型分析的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验菌株为本实验室在2009—2016年北京地区市售食品及北京口岸进境食品中分离纯化并鉴定得到的53株金葡菌,其中,84.91%(45/53)的金葡菌菌株从市售食品中分离,15.09%(8/53)金葡菌菌株从进口食品中分离,具体信息见表1。

表1 53株金黄色葡萄球菌的来源

Table 1 Sources of 53 isolates of *Staphylococcus aureus*

菌株来源	产品类别及菌株数	菌株编号
市售 (n=45)	餐饮食品(n=11)	S12, S21, S28, S29, S30, S31, S32, S34, S35, S36, S73
	蔬菜制品(n=10)	S19, S23, S56, S61, S62, S63, S64, S65, S67, S69
	水产制品(n=3)	S20, S22, S60
	肉与肉制品(n=7)	S6, S24, S25, S45, S46, S57, S58
	冷冻饮品(n=4)	S26, S37, S38, S39
	豆制品(n=2)	S4, S27
进口 (n=8)	速冻米面(n=8)	S42, S43, S44, S47, S48, S49, S50, S55
	水产制品(n=1)	S1
	乳与乳制品(n=7)	S5, S10, S14, S16, S17, S18, S33

注:n表示从某类样品中分离出的菌株数

1.1.2 主要仪器与试剂

Foricell 恒温培养箱(德国 MMM 公司); Veriti 96-well Thermal cycler(美国 Applied Biosystems 公司); 凝胶电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司)。

脑心浸出液(Brain heart infusion, BHI)肉汤、BHI 琼脂(北京陆桥技术有限公司); 溶菌酶、蛋白酶

K、细菌基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司); 溶菌酶(美国 Sigma 公司); DL 2000 DNA Maker、PCR 扩增试剂盒(宝日医生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 检测金葡菌肠毒素基因

18种肠毒素基因的PCR引物序列及扩增产物大小见表2。

表2 金黄色葡萄球菌18种肠毒素基因引物及扩增产物大小

Table 2 Primers and sizes of amplified products of the 18 enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus*

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物大小/bp	来源
sea	sea-F	ATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	552	[11]
	sea-R	TTGCGTAAAAAGTCTGAATT		
seb	seb-F	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	404	[12]
	seb-R	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT		
sec	sec-F	GTAAGTTACAGGTGGCAAACTTG	297	[12]
	sec-R	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT		
sed	sed-F	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	492	[12]
	sed-R	GCTGTATTTTTCTCCGAGAGT		
see	see-F	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	[12]
	see-R	CACCTTACCGCCAAAAGCTG		
seg	seg-F	CCACCTGTTGAAGGAAGAGG	432	[11]
	seg-R	TGCAGAACCATCAAACCTCGT		
seh	seh-F	CACATCATATGCGAAAGCAGA	617	[11]
	seh-R	CCTTTTAAATCATAAATGTGCAATGA		
sei	sei-F	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	529	[11]
	sei-R	CAGGCAGTCCATCTCCTGTA		
sej	sej-F	CAGCGATAGCAA AAATGA AACA	426	[11]
	sej-R	TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA		
sek	sek-F	CGCTCAAGGCGATATAGGAA	570	[11]
	sek-R	GGTAAACCCATCATCTCCTGTGT		
sel	sel-F	CACCAGAATCACACCGCTTA	240	[11]
	sel-R	CTGTTTGATGCTTGCCATTG		
sem	sem-F	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	300	[11]
	sem-R	TTCAGTTTCGACAGTTTGTGTGCAT		
sen	sen-F	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	680	[11]
	sen-R	AACTCTGCTCCCACCTGAAC		
seo	seo-F	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAAGA	180	[11]
	seo-R	ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC		
sep	sep-F	GAATTGCAGGGAAGTCTTT	537	[11]
	sep-R	ACCAACCGAATCACCAGAAG		
seq	seq-F	GAACCTGAAAAGCTTCAAGGA	509	[11]
	seq-R	CCAGTTCCGGTGTAAAACAAA		
ser	ser-F	TTCAGTAAGTGCTAAACCAGATCC	367	[11]
	ser-R	CTGTGGAGTGCATTGTGTAACGCC		
seu	seu-F	ATGCTCTAAAATTGATGGTTCTA	409	[11]
	seu-R	GCCAGACTCATAAGGCGAACTA		

1.2.2 细菌基因组提取

取金葡菌增菌液 500 μ L, 9 391 g 离心 1 min, 吸净上清后, 加入 150 μ L 生理盐水、10 μ L 溶葡萄球菌酶(20 mg/mL)和 20 μ L 溶菌酶(50 mg/mL), 反复吹打使菌体充分悬浮, 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h, 加入 20 μ L 蛋白酶 K 溶液, 随后按细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 产物存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3 PCR 体系及产物凝胶电泳成像

10 \times buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ L, 10 μ mol/L Forward Primer 0.8 μ L, 10 μ mol/L Reverse Primer 0.8 μ L, DNA template 1 μ L, rTaq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 13.6 μ L。上机后 95 $^{\circ}$ C 5 min 预热; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶以 5 V/cm 电压降在凝胶电泳仪中进行电泳。电泳结束后, 将凝胶放置于凝胶成像系统中进行成像。在扩增产物大小处出现特异性扩增片段时, 则认为扩增出该肠毒素基因片段。

1.2.4 全基因组测序

取金葡菌单克隆, 接种到 50 mL BHI 液体培养基中, 36 $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡培养过夜。将菌液倒入 50 mL 离心管, 8 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 10 mL 磷酸盐缓冲液重悬菌体, 再次离心。反复两次后, 用 2 mL 磷酸盐缓冲液重悬菌体, 转移至 1.5 mL 离心管中, 离心速率 13 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清。菌体沉淀送北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组二代测序。建库类型为 350 bp 小片段文库, 测序策略为 Illumina PE150 测序平台双末端测序, 测序深度为 100 \times 。使用 FastQC 软件 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 对测序数据进行质量评估。使用 Trimmomatic v 0.36 软件 (<http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic>) 去除接头, 使用 SPAdes v 3.14.1 软件 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>) 将去掉接头的测序数据组装成 contigs, 使用 quast 软件 (<http://quast.sourceforge.net/>) 对拼接序列的质量进行评估。

1.2.5 VFDB 注释金葡菌肠毒素基因

将基因组数据(contigs)提交到 VFDB 数据库(<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFanalyze>),采用 VFAnalyzer 工具对 53 株金葡菌分离株的肠毒素基因进行分型分析^[10]。

1.2.6 BLASTX 核对

打开 NCBI 网站的 BLASTX 网页(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome),将从 VFDB 注释法分析得到的全部肠毒素基因的

序列上传到 NCBI 中,选择 reference proteins(refseq protein)数据库进行比对。取分值最高且相似度在 99% 以上的结果作为比对结果。

2 结果

2.1 肠毒素基因 PCR 分析结果

图 1 为 S14 分离株的金葡菌肠毒素基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳图谱示例,从图 1 中可以看出,可扩增出 *seb*、*seg*、*sei*、*sem*、*sen* 和 *seo* 基因片段。



图 1 S14 金黄色葡萄球菌分离株肠毒素基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图谱

Figure 1 Gel electrophoresis pattern of PCR amplification products of *Staphylococcus enterotoxin* genes of isolate S14

经 PCR 法检测,共有 45 株携带肠毒素基因,携带率为 84.91%(45/53)。其中,24 株仅携带 1 种肠毒素基因片段,21 株携带 2 种及 2 种以上肠毒素基

因片段,33 株携带新型肠毒素(*seg~sej*)/类肠毒素基因(*sek~seu*)。各分离株肠毒素基因的 PCR 分析结果具体见表 3。

表 3 53 株金黄色葡萄球菌肠毒素基因 PCR 检测结果

Table 3 PCR results of enterotoxin genotypes in 53 strains of *Staphylococcus aureus*

携带肠毒素基因型	检出数目/株	菌株编号
—	8	S10,S26,S28,S29,S31,S32,S49,S58
<i>sea</i>	8	S17,S18,S21,S24,S25,S34,S35,S55
<i>sep</i>	12	S1,S12,S16,S19,S20,S23,S43,S44,S45,S46,S47,S57
<i>seb</i>	4	S30,S37,S38,S39
<i>sea-seh</i>	1	S6
<i>sei-seo</i>	1	S5
<i>sea-sek-seq</i>	1	S22
<i>seb-sek-seq</i>	2	S42,S56
<i>seg-sei-sen-seo</i>	1	S48
<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	1	S27
<i>seb-seg-sei-sem-sen-seo</i>	1	S14
<i>sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	1	S50
<i>sed-seg-sei-sej-sem-sen-seo-ser</i>	5	S4,S33,S60,S61,S62
<i>seb-sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	1	S36
<i>sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	1	S69
<i>sec-sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	5	S63,S64,S65,S67,S73
合计	53	

2.2 肠毒素/类肠毒素基因 VFDB 注释法分析结果

图 2 为金葡菌肠毒素基因 VFDB 注释结果示例,VFDB 注释结果预测 S1 分离株含有 *sea* 基因,S4 分离株含有 *sea*、*seg*、*sek*、*sem*、*sen* 和 *seo* 基因,S14 分离株含有 *seb*、*seg*、*sek*、*sem*、*sen* 和 *seo* 基因。

利用 VFDB 数据库中的 VFAnalyzer 工具对 53 株分离株肠毒素基因分型分析结果见表 4,肠毒素基因携带率为 84.91%(45/53),新型肠毒素/类肠毒素携带率为 62.26%(33/53),与 PCR 检测结果一

致,且未扩增出肠毒素基因的分离株经 VFDB 注释法分析亦表明不含肠毒素基因。45 株携带肠毒素基因的金葡菌分离株中,有 16 株 VFDB 注释的肠毒素基因型与 PCR 检测结果相同,一致率为 35.56%;剩余 29 株 VFDB 注释的肠毒素基因型与 PCR 检测结果不相同,分型不一致的基因型包括:*sea/sed*、*sea/sej*、*sea/sep*、*sea/ser*、*seg/ser*、*sek/sei*(VFDB 分型/PCR 检测)。

VFclass	Virulence factors	Related genes	S1(Prediction)	S4(Prediction)	S14(Prediction)
			draft(draft)	draft(draft)	draft(draft)
Toxin	Enterotoxin A	sea	orf02185	orf02336;orf02351	-
	Enterotoxin B	seb	-	-	orf00580
	Enterotoxin C	sec	-	-	-
	Enterotoxin D	sed	-	-	-
	Enterotoxin E	see	-	-	-
	Enterotoxin G	seg	-	orf02239;orf02335	orf02379
	Enterotoxin H	seh	-	-	-
	Enterotoxin I	sei	-	-	-
	Enterotoxin J	sej	-	-	-
	Enterotoxin-like K	selk	-	orf02243	orf02376
	Enterotoxin-like L	sell	-	-	-
	Enterotoxin-like M	selm	-	orf02244	orf02375
	Enterotoxin-like N	seln	-	orf02240	orf02378
	Enterotoxin-like O	selo	-	orf02245	orf02374
	Enterotoxin-like P	selp	-	-	-
	Enterotoxin-like Q	selq	-	-	-
Enterotoxin-like R	selr	-	-	-	
Enterotoxin-like U	selu	-	-	-	
Table saved from VFDB(http://www.mgc.ac.cn/VFs/)[Tue Jun 30 12:45:57 2020]					

图2 S1、S4、S14金黄色葡萄球菌分离株肠毒素基因VFDB注释法分析结果

Figure 2 VFDB annotation analysis of enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolate S1, S4 and S14

表4 53株金黄色葡萄球菌肠毒素基因VFDB注释法分析结果

Table 4 VFDB analysis of enterotoxin genotypes in 53 isolates of *Staphylococcus aureus*

携带肠毒素基因型	检出数目/株	菌株编号
—	8	S10、S26、S28、S29、S31、S32、S49、S58
sea	20	S1、S12、S16、S19、S20、S23、S43、S44、S45、S46、S47、S57、S17、S18、S21、S24、S25、S34、S35、S55
seb	4	S30、S37、S38、S39
sea-seh	1	S6
sea-sek-seq	1	S22
seb-sek-seq	2	S42、S56
seg-sek-sem-sen-seo	2	S5、S27
seb-seg-sek-sem-sen-seo	1	S14
sea-seg-sek-sem-sen-seo	5	S4、S33、S60、S61、S62
sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo	2	S48、S50
sea-sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo	6	S63、S64、S65、S67、S69、S73
seb-sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo	1	S36
合计	53	

注:黑色加粗斜体表示VFDB注释结果与PCR检测结果分型不一致的基因;黑色加粗字体表示VFDB注释的肠毒素基因型与PCR检测结果不相同的金黄色葡萄球菌分离株

2.3 BLASTX 核对结果

BLASTX 核对结果显示,53株金葡菌分离株中,VFDB注释法的准确率为45.28%(24/53),PCR方法的准确率为94.34%(50/53)。两种金葡菌肠毒素分型分析方法中,PCR方法存在sec、seg、sel、sem、sen、ser假阴性现象,VFDB注释法则存在将sep/ sed/sej误判为sea、ser误判为sea/seg和sei误判为sek的现象。如图2中S1分离株基因组中VFDB注释法分析预测为sea的核酸序列orf02185经BLASTX核对为sep;S4分离株基因组中VFDB注释法分析预测为sea的核酸序列orf02336/orf02351、分析预测为seg的核酸序列orf02239/orf02335以及分析预测为sek的核酸序列orf02243经BLASTX核对分别为sej/sed、seg/ser和sei;S14分离株基因组中VFDB注释法分析预测为sek的核酸序列orf02376经BLASTX核对为sei。45株分离株的肠毒素基因PCR结果、VFDB分型结果及VFDB分析所得核酸序列经BLAST核对结果详见表5。

3 讨论

根据食源性金葡菌风险监测数据,新型肠毒素/类肠毒素基因seg~seh/sek~seu广泛存在^[13-14],其中sej、ser已成为意大利食物中毒事件中常见的新型肠毒素/类肠毒素基因型^[15],携带seh基因的金葡菌已成为辽宁省食源性金葡菌新的优势菌株^[16]。本研究53金葡菌分离株中新型肠毒素/类肠毒素基因携带率也达到了62.26%(33/53)。携带多种新型肠毒素/类肠毒素基因的金葡菌已成为食物中毒的重要风险因子。在食品中开展金葡菌及肠毒素监测时,需要提高对携带的新型肠毒素/类肠毒素基因的金葡菌的筛查水平。

本研究结果表明,PCR方法出现了假阴性结果,主要为新型肠毒素/类肠毒素基因,VFDB注释法可全面检测多种金葡菌肠毒素基因,在新型肠毒素/类肠毒素检测方面具有一定的优势。虽然PCR方法是目前金葡菌肠毒素基因检测的主要技术手段^[8],但是引物设计不适宜和细菌基因组变异都有

表 5 45 株金黄色葡萄球菌肠毒素基因 BLASTX 核对结果
Table 5 BLASTX verification of enterotoxin genotypes in 45 strains of *Staphylococcus aureus*

PCR 检测结果	VFDB 分型结果	BLASTX 核对结果	菌株编号	核对情况
<i>sea</i>	<i>sea</i>	<i>sea</i>	S17、S18、S21、S24、S25、S34、S35、S55	
<i>seb</i>	<i>seb</i>	<i>seb</i>	S30、S37、S38、S39	BLASTX 核对结果与 PCR 检测结果、VFDB 分型结果一致
<i>sea-seh</i>	<i>sea-seh</i>	<i>sea-seh</i>	S6	
<i>sea-sek-seq</i>	<i>sea-sek-seq</i>	<i>sea-sek-seq</i>	S22	
<i>seb-sek-seq</i>	<i>seb-sek-seq</i>	<i>seb-sek-seq</i>	S42、S56	
<i>sep</i>	<i>sea</i>	<i>sep</i>	S1、S12、S16、S19、S20、S23、S43、S44、S45、S46、S47、S57	VFDB 注释法将 <i>sep</i> 误判为 <i>sea</i>
<i>sei-seo</i>	<i>seg-sek-sem-sen-seo</i>	<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	S5	①PCR 未扩增出 <i>seg/sem/sen</i> ②VFDB 注释法将 <i>sei</i> 误判为 <i>sek</i>
<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>seg-sek-sem-sen-seo</i>	<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	S27	
<i>seb-seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>seb-seg-sek-sem-sen-seo</i>	<i>seb-seg-sei-sem-sen-seo</i>	S14	
<i>sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	<i>sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo</i>	<i>sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	S50	VFDB 注释法将 <i>sei</i> 误判为 <i>sek</i>
<i>seb-sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	<i>seb-sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo</i>	<i>seb-sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	S36	
<i>seg-sei-sen-seo</i>	<i>sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo</i>	<i>sec-seg-sei-sel-sem-sen-seo</i>	S48	①PCR 未扩增出 <i>sec/sel/sem</i> ②VFDB 注释法将 <i>sei</i> 误判为 <i>sek</i>
<i>sed-seg-sei-sej-sem-sen-seo-ser</i>	<i>sea-seg-sek-sem-sen-seo</i>	<i>sed-sei-sei-sej-sem-sen-seo-ser</i>	S4、S33、S60、S61、S62	VFDB 注释法将 <i>sei</i> 误判为 <i>sek</i> ； <i>sed/sej</i> 误判为 <i>sea</i> ；未检出 <i>ser</i>
<i>sec-sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	<i>sea-sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo</i>	<i>sec-sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	S63、S64、S65、S67、S73	
<i>sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	<i>sea-sec-seg-sek-sel-sem-sen-seo</i>	<i>sec-sed-seg-sei-sej-sel-sem-sen-seo-ser</i>	S69	①PCR 未扩增出 <i>sec</i> ②VFDB 注释法将 <i>sei</i> 误判为 <i>sek</i> ； <i>sed/sej</i> 误判为 <i>sea</i> ；未检出 <i>ser</i>

注：黑色加粗斜体表示 BLASTX 核对后 VFDB 注释法误判的金黄色葡萄球菌肠毒素基因型别

可能造成非特异性扩增和假阴性现象的发生。目前也有研究将 PCR 扩增产物进行测序,将测序结果与 GenBank 数据库汇总相应序列进行对比,验证 PCR 扩增结果的准确性。当检测基因数量不多时,PCR 方法的检测成本确实比较低。如果需检测的样品数量很多,需要同时检测几十甚至几百个基因,引物合成、PCR 扩增和电泳检测各步骤的试剂耗材成本、人力成本和时间成本都会大大增加,因此 PCR 方法并不是进行多样本多目的基因检测的首选方法。与 PCR 方法相比,以全基因组测序数据为基础的 VFDB 注释法可在较短时间内完成对致病菌毒力因子的全面分析和预测,很大程度上避免 PCR 方法的假阴性结果。

VFDB 数据库收集了大多数典型致病菌毒力因子序列,还提供了毒力因子的功能分类表,整合了比较基因组学工具,是应用广泛的高质量毒力因子公共数据库之一^[17-19]。王伟等^[20]、陈典典等^[21]、万佳宏等^[22]利用 VFDB 数据库分别对沙门菌、肺炎克雷伯菌和牛源金黄色葡萄菌的毒力因子、耐药基因和致病机制开展研究。但是目前大多数此类研究都没有对 VFDB 数据库分析预测结果进行进一步的核实。本研究发现 PCR 方法和 VFDB 注释法对金黄色葡萄菌肠毒素基因的检测存在不一致现象,VFDB 注释法会误判某些肠毒素基因型,采用 BLASTX 比

对校准后,可提高 VFDB 注释法的准确性。出现这种不一致的原因可能是 VFDB 注释法分析和预测致病菌毒力因子主要依赖序列的相似性比对,难以直接识别远缘毒力因子,并且需要预先手工提取特征序列,对毒力因子进行分型时会出现误判^[23]。此外,二代测序得到的基因组序列不完整、VFDB 数据库中参比序列有误和参数设置不合理等原因,也会导致 VFDB 注释法对毒力因子的误判或漏检。王多等^[24]也发现 VFDB 数据库不能完全预测金黄色葡萄菌中本应普遍存在的毒力因子,通过 BLAST 核酸序列比对,可以提高预测结果的一致性和覆盖率。

综上所述,VFDB 注释法是利用海量致病菌基因组数据对毒力因子进行大规模分析预测的有力工具,但是仍存在误判或漏检的风险。为了提高 VFDB 注释法对毒力因子分析预测的准确性,一方面需要 VFDB 数据库构建者优化数据库的比对模型、参比序列和参数设置,另一方面需要使用者选择测序质量较高基因组数据进行比对^[10],将分析预测的毒力因子序列与 GenBank、RefSeq 等比较成熟的数据库中的相应序列进行比对,根据比对情况校准 VFDB 注释结果。

参考文献

- [1] 张兰荣,王连秀,张文利.食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性分析[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):35-36.

- ZHANG L R, WANG L X, ZHANG W L. Contamination and drug resistance of *Staphylococcus aureus* in food[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1): 35-36.
- [2] 何小青. 卫生防疫细菌检验[M]. 北京: 新华出版社, 1989: 486.
- HE X Q. Wei sheng fang yi xi jun jian yan[M]. Beijing: Xinhua Publishing House, 1989: 486.
- [3] KADARIYA J, SMITH T C, THAPALIYA D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 827965.
- [4] FISHER E L, OTTO M, CHEUNG G Y C. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 436.
- [5] BALABAN N, RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(1): 1-10.
- [6] ONO H K, SATO O Y, NARITA K, et al. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7034-7040.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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: GB 4789.10—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. Shi pin an quan guo jia biao zhun shi pin wei sheng wu xue jian yan jin huang se pu tao qiu jun jian yan: GB4789.10—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [8] 向红, 周黎, 廖春, 等. 多重PCR技术在检测食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因中的应用[J]. 现代预防医学, 2015, 42(21): 3949-3951.
- XIANG H, ZHOU L, LIAO C, et al. Application on multiplex PCR for detection the enterotoxin genes in foodborne *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Preventive Medicine, 2015, 42(21): 3949-3951.
- [9] ALLARD M W, BELL R, FERREIRA C M, et al. Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 224-229.
- [10] LIU B, ZHENG D D, JIN Q, et al. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D687-D692.
- [11] XIE Y P, HE Y P, GEHRING A, et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28276.
- [12] JARRAUD S, MOUGEL C, THIOULOUSE J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(2): 631-641.
- [13] 栾阳, 张晔, 张金, 等. 一起由金黄色葡萄球菌及其肠毒素引发食物中毒的实验室检测与分析[J]. 医学动物防制, 2018, 34(11): 1083-1086.
- LUAN Y, ZHANG Y, ZHANG J, et al. Detection and analysis on food poisoning cases caused by *Staphylococcus aureus* and enterotoxin[J]. Journal of Medical Pest Control, 2018, 34(11): 1083-1086.
- [14] 宋明辉, 秦峰, 刘浩, 等. 市售生鲜肉食品中金黄色葡萄球菌基因分型与毒素基因检测[J]. 上海预防医学, 2019, 31(6): 461-465.
- SONG M H, QIN F, LIU H, et al. Genotyping and toxin gene detection of *Staphylococcus aureus* isolated from market fresh meat [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2019, 31(6): 461-465.
- [15] BIANCHI D M, GALLINA S, BELLIO A, et al. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(2): 190-196.
- [16] 于淼, 耿英芝, 魏彤竹, 等. 辽宁省2018年食源性金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分子分型及毒力基因的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(8): 2593-2597.
- YU M, GENG Y Z, WEI T Z, et al. Study of the virulence genes and molecular characteristics in foodborne *Staphylococcus aureus* in Liaoning province in 2018[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(8): 2593-2597.
- [17] CHEN L H, YANG J, YU J, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(S1): D325-D328.
- [18] YANG J, CHEN L H, SUN L L, et al. VFDB 2008 release: An enhanced web-based resource for comparative pathogenomics [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 36(S1): D539-D542.
- [19] KAY G L, SERGEANT M J, GIUFFRA V, et al. Recovery of a medieval *Brucella melitensis* genome using shotgun metagenomics [J]. mBio, 2014, 5(4): e01337-e01314.
- [20] 王伟, 胡豫杰, 徐进, 等. 鼠伤寒沙门菌婴幼儿分离株耐药基因及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(5): 567-575.
- WANG W, HU Y J, XU J, et al. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes in *Salmonella typhimurium* isolated from fecal samples of children under 5-year old by whole genome sequencing[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(5): 567-575.
- [21] 陈典典, 曹敬荣, 白向荣, 等. 基于二代测序的碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌的分子特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(24): 2971-2976, 2980.
- CHEN D D, CAO J R, BAI X R, et al. Next-generation sequencing analysis on molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumonia* [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2021, 42(24): 2971-2976, 2980.
- [22] 万佳宏, 常佳伟, 魏彦琴, 等. 2016—2017年宁夏地区牛源金黄色葡萄球菌的全基因组分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1315-1327.
- WAN J H, CHANG J W, WEI Y Q, et al. Whole-genome analysis of bovine *Staphylococcus aureus* strains in Ningxia from 2016 to 2017 [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1315-1327.
- [23] 郑丹丹. 基于深度学习的病原菌毒力因子预测方法研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- ZHENG D D. A deep learning model for the prediction of bacterial virulence factors [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2020.
- [24] 王多, 陶晓霞, 王文周, 等. ST6型金黄色葡萄球菌食物中毒

菌株的毒力因子分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1): 64-70, 75.
WANG D, TAO X X, WANG W Z, et al. Virulence factors of

sequence type (ST) 6 *Staphylococcus aureus* in food poisoning outbreaks[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(1): 64-70, 75.

[上接第1178页]

举例 [1] 汪国华,马进,季适东,等. 急性出血坏死性胰腺炎的手术治疗[J]. 中级医刊,1995,30(8):22-25.

[2] BERRY R J, LI Z, ERICKSON J D, et al. Preventing neural tube defects with folic acid in China[J]. N Engl J Med, 1999, 314: 1485-1490.

著作或编著:[序号] 主要责任者. 文献题名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(版次为第一版的不用标明). 出版地:出版者,出版年:起页-止页.

举例 图书:[3] 吴阶平,裘法祖,黄家驹. 外科学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 1979: 82-93.

译著:[4] ZIEGLER E E, FILER L J. 现代营养学[M]. 闻之梅,陈君石,译. 7版. 北京:人民卫生出版社, 1998: 126-129.

著作中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 版本项. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页.

举例 [5] 白书农. 植物开花研究[M] // 李承森. 植物科学进展. 北京:高等教育出版社, 1998: 146-163.

会议文献中的析出文献:[序号]析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志/文献载体标志]//会议文献主要责任者. 会议文献题名:其他题名信息. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页[引用日期]获取和访问路径.

举例 [6] 董家祥,关仲英,王兆奎,等. 重症肝炎的综合基础治疗[C]//张定凤. 第三届全国病毒性肝炎专题学术会议论文汇编,南宁,1984. 北京:人民卫生出版社, 1985: 203-212.

科技报告:著录格式同著作或编著。

举例 [7] World Health Organization. Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva:WHO, 1970:1-74.

法令、条例:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志]. 公布日期.

举例 [8] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国著作权法[A]. 2012-03-31.

标准:[序号]主要责任者. 标准名称:标准编号[文献类型标志]. 出版地:出版者,出版年.

举例 [9] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. 科学技术期刊编排格式:GB / T 3179—1992 [S]. 北京:中国标准出版社,1992.

电子文献:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志 / 文献载体标志]. 出版地:出版者,出版年(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

举例 [10] 肖钰. 出版业信息迈入快道 [EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献:[序号]专利申请者. 题名:专利国别,专利号[P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库,本刊所付稿酬已包含这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改,若涉及内容修改会与作者商榷。编辑部收到稿件后,于3个月内通知处理意见。投稿6个月后如未收到修稿或录用通知,作者可自行处理稿件,所收稿件纸质版概不退还。来稿一经采用,即收取版面费,按规定向作者支付稿酬,并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>,并同时邮寄单位介绍信和稿件纸版1份(需第一作者、通信作者和副高以上作者签名)。来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和E-mail地址。编辑部地址:北京市海淀区紫竹院南路17号院3号楼102室《中国食品卫生杂志》编辑部邮政编码:100048 电话:010-68707221 E-mail:spws462@163.com