

meretrix, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with food-borne disease in southern Thailand [J]. Food Prot, 2006, 69: 2615-2620.

[11] 王小英. 检测海产品中副溶血性弧菌的改良法[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(4): 256-257.

论著

食源性金黄色葡萄球菌青霉素类药物耐药基因型的分析

吕国平, 秦丽云, 王芃

(石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 建立多重 PCR 方法检测青霉素酶基因和 *mecA* 基因, 了解食源性金黄色葡萄球菌两种 β -内酰胺类药物耐药基因的分布情况, 为金黄色葡萄球菌引起食源性疾病的防治提供参考数据。方法 建立多重 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌青霉素酶基因、*mecA* 基因和 16S rDNA; 多重 PCR 方法测定食品来源的 171 株金黄色葡萄球菌对青霉素类药物的耐药基因型。结果 165 株菌携带有青霉素酶基因 (96.5%), 9 株菌携带有 *mecA* 基因 (5.3%)。结论 建立的多重 PCR 检测方法快速、简便、准确, 可满足高通量筛选菌株的需求; 食源性金黄色葡萄球菌具有很高的青霉素酶基因携带率, 并存在耐甲氧西林的菌株。

关键词: 金黄色葡萄球菌; β -内酰胺类药物; 青霉素酶基因; *mecA* 基因; 16S rDNA; 食源性致病菌; 耐青霉素敏感基因

中图分类号: R378.11 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)06-0529-04

Genotype analysis of penicillins-resistance in foodborne *Staphylococcus aureus*

Lü Guoping, Qin Liyun, Wang Xian

(Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To establish a multiplex PCR method to detect penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA simultaneously, and investigate the distribution of penicillinase gene, a kind of choloylglycine hydrolase, and *mecA* gene in foodborne *Staphylococcus aureus* strains. **Methods** The multiplex PCR method was established to detect penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA. **Results** 165 strains were detected penicillinase gene with overall positive rate 96.5%, while 9 strains were detected both *mecA* gene and penicillinase gene with overall positive rate 5.3%. **Conclusion** The multiplex PCR method which was rapid, convenient and precise, could be used for high throughput screening of penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA. Most strains of foodborne *Staphylococcus aureus* carry penicillinase gene, and a few of them are methicillin resistant.

Key words: *Staphylococcus aureus*; penicillins; penicillinase gene; *mecA* gene; 16S rDNA; foodborne pathogens; penicillins-resistance

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人类外伤感染中最常见的病原菌, 也是引起食物中毒的常见食源性致病菌, 青霉素类药物的作用主要是抑制革兰阳性菌细胞壁的合成, 自从青霉素问世后, 金黄色葡萄球菌相关疾病的治疗得到了极大改善, 随着青霉素的广泛大量使用, 产青霉素酶的菌株悄然出现并迅速蔓延; 后来人类又发明了耐青霉素酶

的甲氧西林和苯唑西林, 随后又出现了耐甲氧西林、耐苯唑西林的金黄色葡萄球菌菌株^[1-2]。金黄色葡萄球菌携带青霉素酶基因和 *mecA* 基因, 是对青霉素类药物产生耐药的主要原因^[3-4]。

本研究建立了三重 PCR 快速检测体系, 能够同时扩增两个耐药基因 *mecA* 基因、青霉素酶基因和一个内参照基因 16S rDNA。通过检测 *mecA* 基因和青霉素酶基因的分布状况, 在基因型上评价食源性金黄色葡萄球菌对青霉素类药物的耐药状况, 为探究金黄色葡萄球菌的耐药现状提供科学数据。

收稿日期: 2012-07-11

作者简介: 吕国平 女 主管检验师 研究方向为卫生微生物

E-mail: lvguoping116@163.com

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验室保存的 2010—2011 年各种食品来源的 171 株金黄色葡萄球菌,菌株的鉴定按照《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] 进行;金黄色葡萄球菌质控菌株(ATCC 6538)购自中国军事医学科学院消毒检测中心。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂

营养琼脂、Multiplex PCR Assay Kit(大连宝生物)、PCR 引物由上海生工合成。

1.2.2 主要仪器

FRIOCELL III 型霉菌培养箱(德国 MMM 公司),

PTC-220 型基因扩增仪(美国 MJ Research 公司), QIAXCL 毛细管电泳仪(德国 QIAGEN 公司)。

1.3 方法

1.3.1 煮沸法制备金黄色葡萄球菌 DNA 基因组模板

从营养琼脂平板挑取 2~3 个典型菌落,放入含 500 μl 无菌超纯水的 1.5 ml EP 管中,混匀,在沸水中煮 20 min;取出置于冰上 5 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

1.3.2 引物设计

用 GenBank、BLAST 等网上数据库与生物信息学软件分析平台以及 Primer Premier 5.0 等分析软件,筛选设计青霉素酶基因、mecA 基因和 16S rDNA 的引物序列(如表 1)。

表 1 引物序列及片段长度信息

Table 1 Information of the primer sequence and objective fragments length				
目的基因	Gene Bank 登录号	引物编号及序列		目的片段长度(bp)
青霉素酶	CP000703.1	P-1	5'-TTCGCCAGCAGTGACGCCT-3'	204
		P-2	5'-TCGCGTCCGCTTTGTGTGTTGA-3'	
mecA	NC_002952.2	M-1	5'-ACCACCCAATTTGTCTGCCAGTT-3'	818
		M-2	5'-TGGCTCAGGTAATGCTATCCACCC-3'	
16S rDNA	NC_002952.2	16S-1	5'-GGCGTTGCTCCGTCAGGCTT-3'	375
		16S-2	5'-CGCTGGCGCGCTGCCTAAT-3'	

1.3.3 单重 PCR 反应体系

Multiplex PCR Mix 2 25 μl,引物 1(20 μM)0.5 μl,引物 2(20 μM)0.5 μl, Multiplex PCR Mix 1 0.25 μl,模板 6 μl,加超纯水至 50 μl。扩增条件:94 ℃ 30 s,64 ℃ 60 s,35 个循环;PCR 产物经毛细管电泳出现目的条带后,送生工测序。

1.3.4 多重 PCR 快速检测体系的建立与应用

利用 Multiplex PCR Assay Kit 试剂建立青霉素酶基因、mecA 基因和 16S rDNA 的多重 PCR 快速检测体系,并对 171 株食源性金黄色葡萄球菌进行筛选。PCR 产物进行毛细管电泳检测。

2 结果

2.1 引物特异性验证

利用单对引物对实验室的 11 个菌株进行盲筛,出现的条带均为单一条带,电泳显示的片段长度与目的片段长度一致,见图 1。选择 2 株实验室菌株菌 S-001、S-002 的 PCR 产物送测序,测序结果如图 2.1~图 2.3,在 GenBank 上比对,扩增出的青霉素酶基因目的片段与登录号为 ACKI01000032.1 的金黄色葡萄球菌 penicillin amidase 相似度为 99%,扩增出的 16S rDNA 和 mecA 目的片段与登录号为 NC_002952.2金黄色葡萄球菌的相似度分别为 99%和 100%。3 个 PCR 片段均是研究需要的目的片段,特异性均符合实验要求。

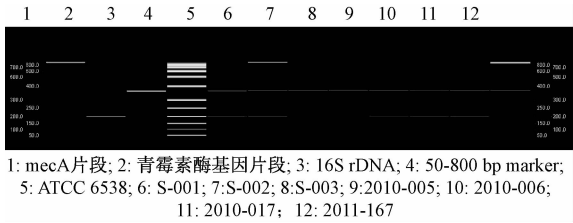


图 1 PCR 产物的毛细管电泳图谱

Figure 1 PCR products by capillary electrophoresis

2.2 多重 PCR 检测体系

实验室菌株 S-001、S-002 和 S-003 作为参照菌株,通过调节退火温度、模板浓度和多重引物浓度比例等措施,优化多重 PCR 反应体系。该优化反应体系如下:Multiplex PCR Mix 2 25 μl,P-1(20 μM)0.4 μl,P-2(20 μM)0.4 μl,M-1(20 μM)0.4 μl,M-2(20 μM)0.4 μl,16S-1(20 μM)0.4 μl,16S-2(20 μM)0.4 μl,Multiplex PCR Mix 1 0.25 μl,模板 6 μl,加超纯水至 50 μl。扩增条件:94 ℃ 预热 2 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。

优化后的多重 PCR 检测结果见图 1。结果表明,此 3 株菌均扩增出 16S rDNA 目的片段,S-001 和 S-003 扩增出的青霉素酶的大小和目的片段一致;S-001 扩增出 mecA 基因,大小和目的片段一致。因此 S-001、S-002 和 S-003 都可作为外部对照菌株,16S rDNA 可以作为内部对照基因。

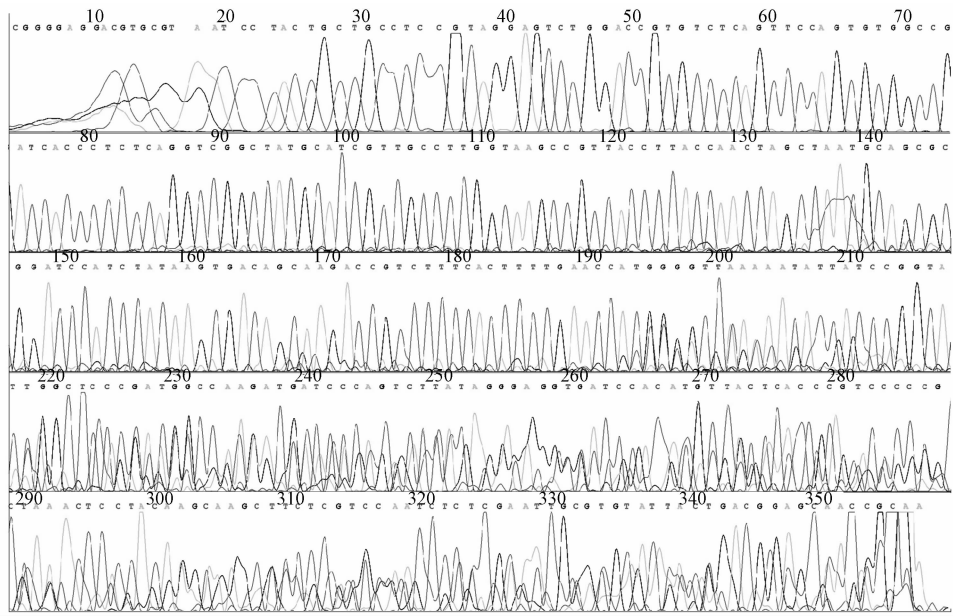


图 2.1 16S 目的片段的测序结果
Figure 2.1 Sequencing map of 16S fragment

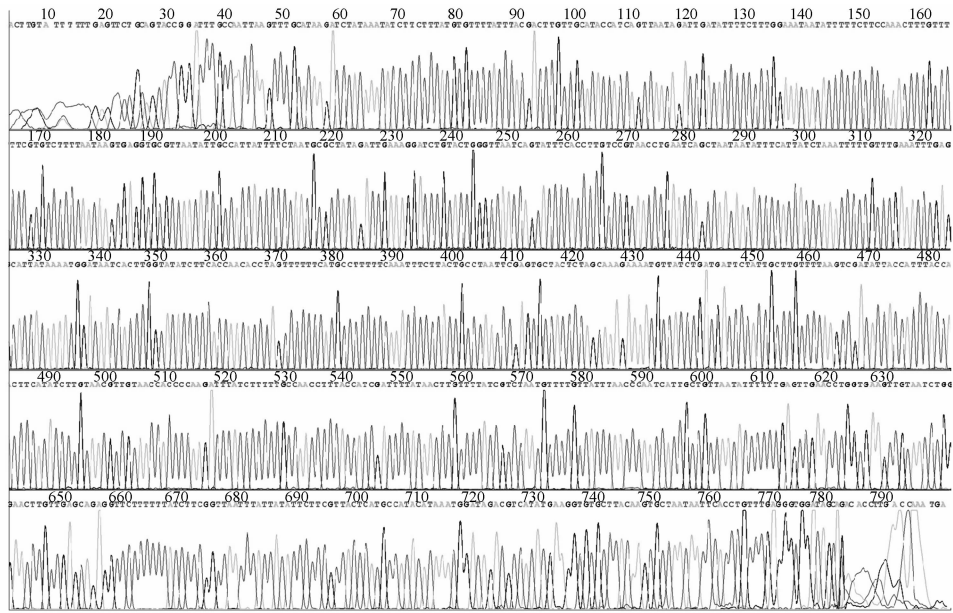


图 2.2 mecA 目的片段的测序结果
Figure 2.2 Sequencing map of mecA fragment

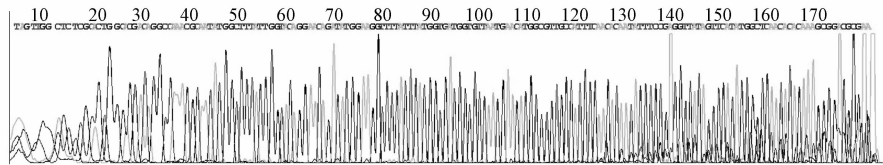


图 2.3 金黄色葡萄球菌青霉素酶的测序结果
Figure 2.3 Sequencing map of *Staphylococcus aureus* penicillinase gene fragment

2.3 多重 PCR 体系快速检测结果

选择菌株 S-001 和 S-002 作为外部对照菌株,多重 PCR 快速检测 171 株金黄色葡萄球菌的耐药基因 mecA、青霉素酶基因和一个内参照基因 16S rDNA,171 株菌的 16S rDNA 均为阳性,内部参照基因的扩增结果非常稳定。165 株金黄色葡萄球菌被

检出含有青霉素酶基因,检出率为96.5%;9株金黄色葡萄球菌被检出 *mecA* 基因,检出率为5.3%;此9株菌同时被检出青霉素酶基因和 *mecA* 基因,多重PCR检测的部分结果见图1,2010-005、2010-006、2010-017和2011-167为实验室保存的食源性金黄色葡萄球菌。

3 讨论

对 β -内酰胺类抗生素产生抵抗的金黄色葡萄球菌主要有3类:一类是产生 β -内酰胺酶,分解 β -内酰胺类抗生素,细菌可继续生长,青霉素酶基因是最常见 β -内酰胺酶基因;一类是产生过量的青霉素结合蛋白,使正常浓度的抗生素不能完全破坏细菌细胞壁的合成,部分细菌可继续生长;第三类是携带 *mecA* 基因,可编码青霉素结合蛋白2a,它与 β -内酰胺类抗生素的亲合力极低,因此在其他青霉素结合蛋白被抑制时,青霉素结合蛋白2a仍可发挥作用,完成细菌细胞壁的合成,细菌可继续生长繁殖^[6]。*mecA* 又称为甲氧西林耐药基因,所以含 *mecA* 的金黄色葡萄球菌称为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。因此选择 *mecA* 和青霉素酶两种 β -内酰胺类耐药基因对食源性金黄色葡萄球菌耐药状况进行研究,进而为研究食源性金黄色葡萄球菌对青霉素类药物的耐药机制提供分子水平的依据。

食源性金黄色葡萄球菌普遍携带青霉素酶基

因,并存在耐甲氧西林的菌株。一旦耐甲氧西林菌株成为流行菌株,势必给金黄色葡萄球菌的防控工作带来很大的挑战,因此相关部门应该提高食品安全意识,加强食品卫生监督,切断金黄色葡萄球菌潜在的传播途径。

本研究建立的三重PCR快速检测体系,能够同时扩增两个耐药基因 *mecA*、青霉素酶基因和一个内参照基因16S rDNA。该检测体系具有高特异性、可满足高通量筛选菌株的需求,是探究金黄色葡萄球菌耐药分子机制及监测耐药基因型分布的重要方法。

参考文献

- [1] 李娟,韩艳.连续5年金黄色葡萄球菌耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2010,20(24):4008-4010.
- [2] 沈慧霞,阳帆,杨洪,等.金黄色葡萄球菌分离株耐药谱研究[J].实用预防医学,2009,16(6):1718-1720.
- [3] 孙茜.金黄色葡萄球菌抗生素耐药表型及基因型研究[D].石家庄:河北医科大学,2007.
- [4] 陈庆增,罗兵,孙迎娟,等.*mecA* 基因在金黄色葡萄球菌中的分布及对耐药性的影响[J].中华医院感染学杂志,2009,19(9):1028-1031.
- [5] 中华人民共和国卫生部.GB 4789.10—2010 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[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 韩文瑜,冯书章.现代分子病原细菌学[M].吉林:吉林人民出版社,2003:340-346.

《中国食物与营养》2013年征稿征订启事

中国科技核心期刊 中国农业核心期刊

《中国食物与营养》创办于1995年,由农业部主管,中国农业科学院、国家食物与营养咨询委员会主办的食物与营养领域相结合的综合性月刊,国内外公开发行。

办刊宗旨:立足于农业、食物、营养领域的结合,报道国家在食物与营养相关领域的方针、政策、法规、标准等;刊登食物生产、食物消费、食品工业、食物营养等方面的发展动态和科技成果;普及宣传营养保健、膳食指南等方面的知识等。

本刊主要栏目有:专题论坛、食物安全、资源与生产、食品工业、消费与流通、新技术新产品、营养与保健、膳食营养调查等。

欢迎大家踊跃投稿和订阅《中国食物与营养》杂志。

《中国食物与营养》杂志由北京报刊发行局发行,邮发代号为82-597。本刊为月刊,每期定价15元,全年180元。也可直接汇款到编辑部订阅(免费邮寄)。

地址:北京市海淀区中关村南大街12号《中国食物与营养》编辑部

电话:(010)82109761 传真:(010)82106285 邮编:100081

网址:www.sfncc.org.cn

E-mail:foodandn@263.net