

## 论著

2005—2012年宁波市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因  
和多位点序列分型研究

高红,宋启发,郑剑,徐景野,杨元斌,沈玄艺,章丹阳,闫鹏

(宁波市疾病预防控制中心,浙江宁波 315010)

**摘要:**目的 了解宁波市食源性金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)肠毒素基因分布和分子分型特征。方法 收集2005—2012年宁波市食品中金黄色葡萄球菌菌株,利用聚合酶链式反应(PCR)检测肠毒素A、B、C和D基因(*sea*, *seb*, *sec*和*sed*),对肠毒素基因阳性菌株利用多位点序列分型(MLST)进行分子分型。结果 2005—2012年共分离菌株190株,肠毒素基因阳性菌株为41株,阳性率为21.58%。4种肠毒素基因阳性率分别为7.37%(14/190)、5.26%(10/190)、8.95%(17/190)和5.79%(11/190),其中13株菌株具有两个及两个以上肠毒素基因。41株菌株可分为12个序列型(ST),以ST5、ST6、ST188和ST1为主,共占75.61%(31/41),在进化树上主要形成4个分支。结论 2005—2012年宁波市食品中金黄色葡萄球菌携带肠毒素基因频率较高,需加强监测。肠毒素基因阳性菌株与中国其他地区食品株在分子分型上存在较大差异。

**关键词:**金黄色葡萄球菌;肠毒素基因;多位点序列分型;食源性致病菌;食品安全;风险监测

中图分类号:R155.5;R378.1<sup>+</sup>1 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)04-0349-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.04.001

**Analysis on enterotoxin genes and multi-locus sequence typing of foodborne  
*Staphylococcus aureus* isolated from Ningbo**

GAO Hong, SONG Qi-fa, ZHENG Jian, XU Jing-ye, YANG Yuan-bin, SHEN Xuan-yi,  
ZHANG Dan-yang, YAN Peng

(Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315010, China)

**Abstract:** **Objective** To understand enterotoxin genes distribution and molecular characteristics of foodborne *Staphylococcus aureus* isolated from Ningbo. **Methods** Enterotoxin gene A, B, C and D were detected by polymerase chain reaction (PCR). Molecular characteristics were acquired by multi-locus sequence typing (MLST). **Results** 190 strains of foodborne *S. aureus* were isolated during 2005-2012. 41 strains were positive for enterotoxin gene. The positive rate of 4 enterotoxin genes were 7.37%, 5.26%, 8.95% and 5.79%, respectively. 13 strains harbored at least two enterotoxin genes. 41 strains could be divided into 9 kinds of enterotoxin gene spectrum and 12 sequence types (STs) by MLST. ST5, ST6, ST188 and ST1 were the major STs. The positive rate of 4 STs was 75.61%. Four branches were formed in the phylogenetic tree. **Conclusion** The positive rate of enterotoxin gene was relatively high in foodborne *S. aureus* during 2005-2012, and monitoring needed to be strengthened. There were significant difference in molecular typing between the strains with enterotoxin gene in Ningbo and those food isolates from other part of China.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; enterotoxin genes; multi-locus sequence typing; food-borne pathogenic bacteria; food safety; risk monitoring

金黄色葡萄球菌引起的胃肠炎起病急、症状重,摄入半小时就可引起呕吐、发热和腹泻等症状,严重者会导致脱水、电解质紊乱甚至休克死亡,所以一直以来都是食品污染物监测项目的研究重点。在美国

由该菌引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的33%,加拿大则高达45%<sup>[1]</sup>。肠毒素是金黄色葡萄球菌的主要致病因子,1 μg/kg就能达到人的中毒剂量<sup>[2]</sup>。目前肠毒素主要分为SEA~SEO,以SEA~SED最为常见<sup>[3,4]</sup>。1998年Maiden等人建立了多位点测序分型(multilocus sequence typing, MLST)技术,该技术以分析管家基因的序列多态性为基础<sup>[5]</sup>。该方法重复性好,实验室间可以进行数据共享,为分析金黄色葡萄球菌遗传相关性、探索菌株的起源和进化

收稿日期:2014-09-24

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2013A610246);创新团队项目(2012B82018);社发重大重点项目(2013C51014)

作者简介:高红 女 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail: gaohong@nbcdc.org.cn

提供了巨大的信息资源。目前 MLST 多用于临床菌株的分析与研究,对食源性菌株的研究比较少。为掌握宁波市食品中金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布以及分子分型特征,进行了相关研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源与鉴定

2005—2012年宁波市食品污染物监测样品中分离的190株金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)均由宁波市疾病预防控制中心微生物检验科提供。按照标准的实验室操作规范,采用食品安全国家标准 GB 4789.10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌》<sup>[6]</sup>及 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪对其进行鉴定均为金黄色葡萄球菌。*S. aureus* 标准菌株为(ATCC 29213,美国微生物)。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK-2 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃),PCR 仪(德国艾本德),VersaDoc Model 3000 凝胶成像仪、电泳仪均购自美国伯乐,ABI3730 全自动基因分析仪(上海英骏公司)。MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(3.0 版)、Premix Taq™ 试剂盒(2.0 版)均购自日本 Takara,PCR 试剂和 200 bp DNA ladder Marker 均购自大连宝生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中公布的基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。*sea*、*seb*、*sec* 和 *sed* 基因扩增引物见表 1,引物均由上海英骏公司合成。MLST 扩增和测序引物参考文献<sup>[7]</sup>。

表 1 4 种肠毒素基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primer Sequence of four enterotoxin gene by PCR

目的基因	引物	引物序列(5'-3')	扩增产物 /bp
<i>sea</i>	<i>sea</i> -F	TGGTGCTTATTATGGTTATC	217
	<i>sea</i> -R	TCTTGCTTGAAGATCCAAC	
<i>seb</i>	<i>seb</i> -F	AAGGACACTAAGTTAGGGAA	443
	<i>seb</i> -R	ATCATGTCATACCAAAAAGCT	
<i>sec</i>	<i>sec</i> -F	CTCAAGAAGTACATATAAAAGCTAGG	271
	<i>sec</i> -R	TCAAAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	<i>sed</i> -F	ATAGTAGTTTACCTGGGTGC	429
	<i>sed</i> -R	AGTGTTCTTGATTAGCGTTT	

#### 1.2.2 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取

采用 MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照试剂说明书操作提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA。

#### 1.2.3 肠毒素基因扩增

采用 Premix Taq™ 试剂盒,按照试剂说明书配置 PCR 反应体系。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,

94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。取扩增产物 10 μl 点样于 1% 琼脂糖凝胶(内含溴化乙锭最终浓度为 0.5 μg/ml),电压 10 V/cm,电泳 30 min,暗室内紫外光下(波长 254 ~ 365 nm)观察电泳结果,观察是否有预期分子量大小的条带出现。

#### 1.2.4 金黄色葡萄球菌 MLST 扩增、测序和数据分型<sup>[7]</sup>

选择金黄色葡萄球菌的 7 个管家基因 *arc*、*aro*、*glp*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqi* 进行 PCR,扩增产物利用 ABI3730 全自动基因分析仪采用测序引物对扩增的片段进行正反方向核苷酸序列测定,测序结果利用软件 Chromas 编辑和拼接,用 Bioedit 进行校正,校正后的序列与金黄色葡萄球菌 MLST 标准数据库<sup>[8]</sup>进行比对,获得各管家基因位点的等位基因数值,并形成相应的等位基因谱,判断其序列型(sequence type,ST)。利用 Mega 6.0 对管家基因核苷酸序列构建系统进化树,利用 eBURST V3 软件对 ST 进行分析。参考菌株来自金黄色葡萄球菌 MLST 标准数据库。

## 2 结果

### 2.1 肠毒素基因检测结果

金黄色葡萄球菌菌株 4 种肠毒素基因总检出率为 21.58% (41/190),其中检出 *sea* 阳性株 14 株(7.37%),*seb* 阳性株 10 株(5.26%),*sec* 阳性株 17 株(8.95%),*sed* 阳性株 11 株(5.79%)。同时检出两个及两个以上肠毒素基因的菌株有 10 株,其中 *sea* + *seb* 共阳性 1 株,*sea* + *sec* 共阳性 3 株,*seb* + *sec* 共阳性 3 株,*sec* + *sed* 共阳性 2 株,*seb* + *sec* + *sed* 共阳性 1 株。具体检测结果见表 2。

### 2.2 肠毒素基因阳性金黄色葡萄球菌 MLST 分型结果

41 株菌株可分为 12 个 ST。ST5 的菌株有 14 株,占 34.15%;ST6 和 ST188 的菌株均为 6 株,各占 14.63%;ST1 的菌株有 5 株,占 12.20%;ST25 和 ST59 各 2 株,ST7、ST9、ST88、ST398、ST1094 和 ST1920 各 1 株。菌株肠毒素基因分布与主要 ST 分型结果见表 3。

### 2.3 肠毒素基因阳性金黄色葡萄球菌食品株 eBURST V3 软件分析结果

从金黄色葡萄球菌 MLST 标准数据库中选择中国食品中分离的菌株作为参照,利用 eBURST V3 软件绘制菌株 ST 分布图,见图 1。数据库中中国食源性菌株共有 91 株,分为 60 个 ST。ST97 的菌株有 21 株,占 23.08%;ST398 的菌株有 5 株,占 5.49%;

表2 2005—2012年宁波市食品中金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布情况(株)  
Table 2 Distribution of enterotoxin genes of *S. aureus* isolated from food during 2005-2012

年份	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>sea + seb</i>	<i>sea + sec</i>	<i>seb + sec</i>	<i>sec + sed</i>	<i>seb + sec + sed</i>
2005	1	1	0	4	0	0	0	0	1
2006	5	3	5	1	0	1	1	0	0
2007	1	0	0	0	0	2	0	0	0
2008	0	0	0	2	0	0	0	1	0
2009	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	2	0	2	0	1	0	1	1	0
2012	0	1	1	1	0	0	1	0	0

表3 金黄色葡萄球菌肠毒素基因与主要ST分型结果(株)

Table 3 Relationship of enterotoxin genes distribution and major sequence type of *S. aureus*

基因	ST5	ST6	ST188	ST1
<i>sea</i>	1	4	2	1
<i>sec</i>	3	1	1	1
<i>sed</i>	6	0	2	0
<i>seb</i>	1	0	0	0
<i>sea + sec</i>	0	1	0	2
<i>seb + sec</i>	1	0	1	0
<i>sec + sed</i>	1	0	0	1
<i>seb + sec + sed</i>	1	0	0	0

### 3 讨论

根据2003—2005年中国食品污染物和食源性疾病监测项目数据统计,金黄色葡萄球菌引起的食物中毒在细菌性感染中占第4位,其中以A型肠毒素引起的食物中毒为主,B型居于第二位,C型和D型比较少见。浙江地区金黄色葡萄球菌引起的食物中毒仅次于副溶血性弧菌位于第2位<sup>[9]</sup>。杭州的张俊彦等<sup>[10]</sup>研究结果显示食源性金黄色葡萄球菌各型肠毒素基因的比例分别为 *sea* 占40.10%、*seb* 占40.10%、*sec* 占14.13%,未检测到 *sed*。温州的章乐怡等<sup>[11]</sup>研究发现食源性金黄色葡萄球菌各型肠毒素基因的比例分别为 *sea* 占23.30%、*seb* 占9.71%、*sec* 占8.74%、*sed* 占7.77%。台州的沈伟伟等<sup>[12]</sup>发现食源性金黄色葡萄球菌各型肠毒素基因的比例分别为 *sea* 占21.4%、*seb* 占7.1%、*sec* 占2.4%,未检测到 *sed*。2005—2012年从宁波市食品中分离到190株金黄色葡萄球菌,肠毒素基因阳性的有41株,检出率为21.58%,其中 *sec* 的检出率最高为8.95%,其次为 *sea* (7.37%)、*sed* (5.79%) 和 *seb* (5.26%)。以上数据表明食源性金黄色葡萄球菌携带肠毒素基因频率较高,但肠毒素基因的类型以及携带率有极大的差异,这些差异可能与地域分布以及分离菌株的食品种类有关。

同一株金黄色葡萄球菌可以检测到两种或两种以上肠毒素基因型,且不同基因型的检出率与菌株有一定的关联度<sup>[13]</sup>。王丽等<sup>[14]</sup>发现81株食源性菌株和104株食物中毒来源菌株中这4种肠毒素基因检出共有7种类型。本课题组在41株食源性菌株中发现9种类型。

目前在MLST数据库中金黄色葡萄球菌可以分成2840种ST,共收录了4929株菌株的相关信息,而中国食源性菌株只有91株。按照ST单点变异型(single-locus variant, SLV)值 $\geq 3$ 为一个克隆群,具有最大SLV值的ST为主要起源。经eBURST V3分析显示,中国食源性菌株ST分布存在5个克隆群ST97、ST5、ST398、ST1和ST9,最大克隆群为ST97,

注:数字表示ST,⑤为宁波食源性菌株特有ST,

其余为中国其他地区食源性菌株ST,ST为两种来源均有

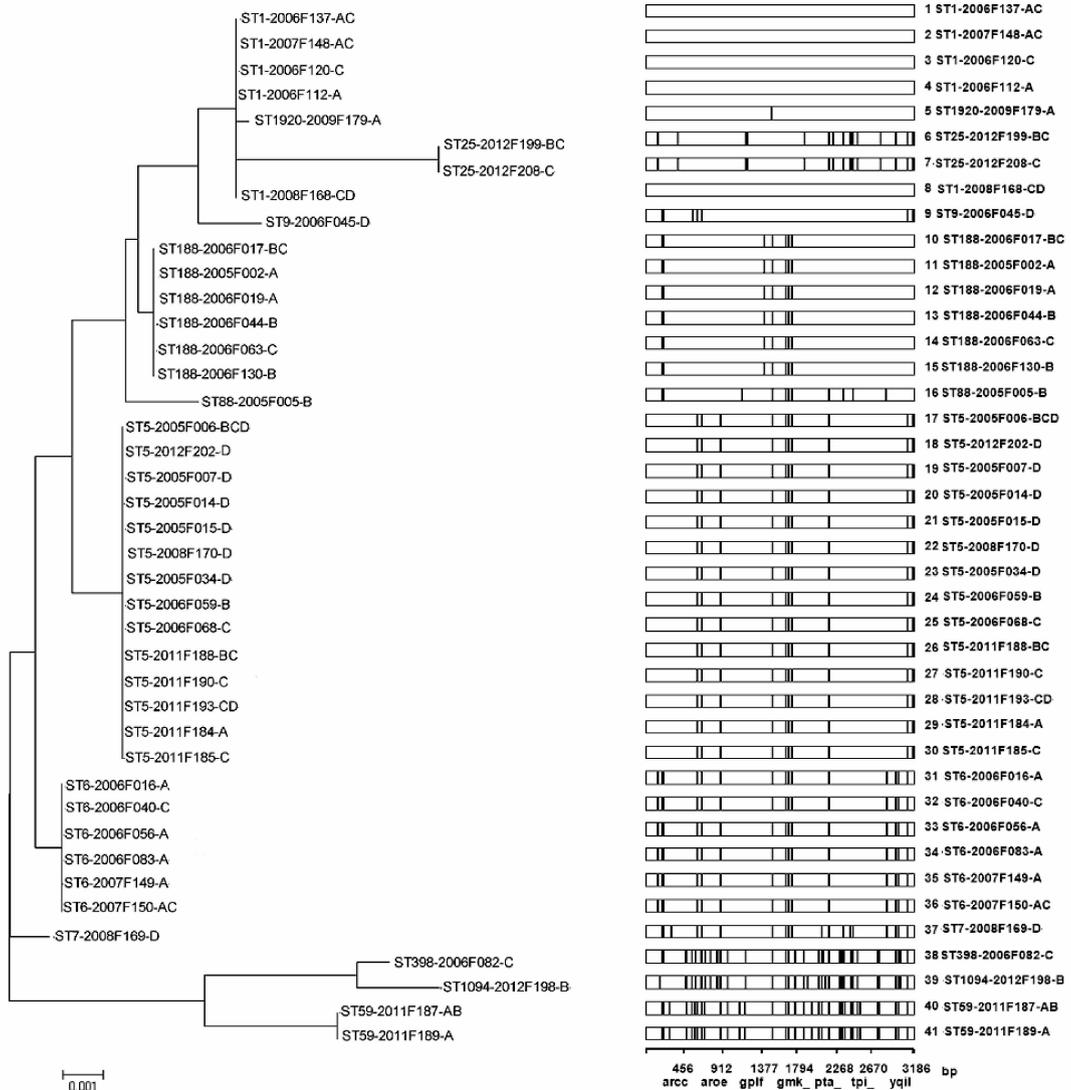
图1 eBURST V3软件分析肠毒素基因阳性食源性金黄色葡萄球菌ST分布

Figure 1 ST distribution of *S. aureus* strains with enterotoxin genes from food analyzed with eBURST V3

ST2154有3株,其他ST只有1~2株。

2.4 7个管家基因连接序列Mega 6.0软件分析结果

41株能进行ST分型的菌株按照形成ST的顺序将7个管家基因连接成长度为3186 bp的多基因序列,利用Mega 6.0软件采用Maximum Likelihood方法绘制系统进化树。从图2可知41株菌株在进化树上主要形成4个分支。以ST1-2006F137-AC作为标准序列,其他40条序列出现76个碱基变异位点,总碱基变异数为390,变异率为0.30%,具体结果见图2。



注:菌株编号为 ST-年份 F 菌株编号-肠毒素基因,右侧条图黑线表示与 1 号菌株相比该处核苷酸有差异

图 2 宁波肠毒素基因阳性食源性金黄色葡萄球菌的 7 个管家基因系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree of 7 house-keeping genes of *S. aureus* strains with enterotoxin genes from food in Ningbo

主要起源克隆群为 ST398 ( $SLV = 6$ )。宁波未发现 ST97 克隆群,其他 4 群共存但以 ST5 克隆群为主。这种差异可能是因为本次研究的宁波市金黄色葡萄球菌菌株均为肠毒素阳性的食源性菌株,而 ST97 克隆群可能是由肠毒素阴性的金黄色葡萄球菌构成。与全国其他地区食源性菌株相比,宁波市分离的肠毒素阳性的金黄色葡萄球菌菌株有 8 种新 ST。ST1、ST5、ST59、ST88 和 ST188 型菌株在日本和欧美等国家患乳腺炎的奶牛所产生牛奶中有检出。而 ST7、ST1094 和 ST1920 菌株在病人和携带者中检出。

41 株菌株在进化树上分为 4 个分支,ST6 型分支主要由 2006—2007 年分离的携带 *sea* 和 *sec* 菌株构成;ST188 分支则由 2005—2006 年分离菌株组成,ST1 分支则由 2006—2009 年以及 2012 年分离的携带 *sea* 和 *sec* 菌株组成。主要克隆群 ST5 分支则由 2005—2006 年、2008 年、2011—2012 年分离的

携带 *sed* 和 *sec* 菌株组成,说明该克隆群是宁波市近年来肠毒素阳性食源性菌株的主要流行型别。肠毒素基因分布和 MLST 分型之间是否存在一定的关联还需要进一步研究。

(志谢 文中使用的金黄色葡萄球菌 MLST 数据库由 Wellcome 信托基金资助,位于伦敦的帝国理工学院,在此表示感谢)

### 参考文献

[ 1 ] 张兰荣,王连秀.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.  
 [ 2 ] 梁毅珊.金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法的研究进展[J].中国热带医学,2008,8(9):1658-1659.  
 [ 3 ] Zschock M,Kloppert B,Wolter W,et al. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *she*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis[J].Vet Microbiol,2005,108(3/4):243-249.  
 [ 4 ] 沈玄艺,宋启发,徐景野,等.食源性金黄色葡萄球菌肠毒素

- 基因型分布研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 427-429.
- [5] Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 10—2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] Enright M C, Day N P, Davies C E, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.
- [8] David A. Multi locus sequence typing[DB/OL]. Imperial College London: Wellcome Trust. 2007 (2014-07-15) [2014-07-20]. <http://saureus.mlst.net/>.
- [9] 张严俊, 王志刚, 程苏云, 等. 金黄色葡萄球菌食品和病人分离株肠毒素基因和耐药性比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 33-35.
- [10] 张俊彦, 张严峻, 朱敏, 等. 金黄色葡萄球菌食品分离株肠毒素基因型分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6): 1417-1418.
- [11] 章乐怡, 李毅, 马雪莲. 食物中毒及食品中金黄色葡萄球菌的肠毒素及基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2851-2853.
- [12] 沈伟伟, 裘丹红, 徐佳, 等. 台州市食源性金黄色葡萄球菌的主动监测及肠毒素基因分布研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(11): 2674-2676.
- [13] Akineden O, Annemüller C, Hassan A A, et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(5): 959-964.
- [14] 王丽, 王冰, 黎桂莲, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素快速分型体系的建立及应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 154-156.

## 论著

# 基于 *tdh1* 基因变异的大流行副溶血性弧菌鉴别方法的建立

陈洪友, 屠丽红, 宋元君, 陈敏, 张曦  
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

**摘要:**目的 基于副溶血性弧菌 *tdh1* DNA 序列中特异性变异位点, 建立新的大流行株鉴别方法。方法 通过对多种型别菌株的 *tdh* 序列进行比对, 查找大流行株特异性变异位点, 并基于该位点设计位点特异性 PCR 体系和检测方法。以 GS-PCR 和 *tdh* 基因联合检测为参照方法, 用已知大流行株、非大流行株和 2014 年收集的 1 067 株副溶血性弧菌对新方法进行验证。结果 3 株菌株的 6 条 *tdh* 全序列存在 26 个多态性位点, 其中 *tdh1* 基因的第 368 位碱基的变异[G/A]能用于鉴别大流行株, 本研究基于此位点建立了 *tdh1*\_368 位点特异性 PCR。该变异性能将 1996 年后的大流行 O3:K6 型菌株与 1996 前的进行区分, 也能将大流行株其他血清型变种与非流行菌株进行区分。对 2014 年的 1 067 株菌株的检测结果显示, *tdh1*\_368 位点特异性 PCR 与参考方法检测结果完全一致。结论 本研究以副溶血性弧菌 *tdh* 基因的多态性位点建立检测大流行菌型的试验方法, 从对 1 067 株菌株的实测结果来看, *tdh1*\_368 位点特异性 PCR 与既往报道的方法具有高度的一致性, 且指标更为直接。

**关键词:** 副溶血性弧菌; *tdh*; PCR; 食源性致病菌; 鉴别方法

中图分类号: R155.5; R378.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)04-0353-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.002

## An allele-specific PCR for identifying *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains based on *tdh1* mutation

CHEN Hong-you, TU Li-hong, SONG Yuan-jun, CHEN Min, ZHANG Xi

(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract: Objective** The aim of this research was to establish a novel method based on *tdh1* gene variation for identifying *V. parahaemolyticus* pandemic strains. **Methods** *tdh* sequences from various strains were compared, and specific sites for pandemic strains were searched. Allele-specific PCR was established based on the selected site, and verified by known isolates and isolates from 2014, compared with the joint of GS-PCR and *tdh* method as a reference methods. **Results** 26 sites in 6 *tdh* sequences from 3 isolates showed polymorphism, and only the 368<sup>th</sup> base could be

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 国家“十二五”科技国家科技重大专项(2013ZX10004216-001-004)

作者简介: 陈洪友 男 主管医师 研究方向为致病性弧菌检测 E-mail: chenhongyou@scdc.sh.cn

通讯作者: 陈敏 男 主任技师 研究方向为病原微生物的实验室检测 E-mail: chenmin@scdc.sh.cn