

## 论著

## 金黄色葡萄球菌食品分离株肠毒素基因分布及分型研究

张红芝<sup>1</sup>,朱召芹<sup>2</sup>,陈海丽<sup>2</sup>,崔琳<sup>1</sup>,刘钢<sup>1</sup>,孙双福<sup>1</sup>,顾其芳<sup>1</sup>

(1.上海市疾病预防控制中心,上海 200336;

2.上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心,上海 201508)

**摘要:**目的 对2006—2009年上海市 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 食品分离株进行肠毒素基因检测和基因分型研究,以了解肠毒素基因的分布规律及 *S. aureus* 的流行特点。方法 利用PCR方法检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素基因,包括5种传统肠毒素基因(SEA-SEE)和4种新型肠毒素基因(SEG-SEJ);利用脉冲场凝胶电泳法对49株食品分离株进行基因分型。结果 本研究发现49株食品分离株中有19株含有肠毒素基因,16株含有传统肠毒素SEA和SEC,且SEC占93.8%,并检测到新型肠毒素SEG、SEI、SEJ和SEH。PFGE法基因分型显示5株菌不能被分型,其余44株可分为28个基因型,表现为基因型的多样性,且分离自不同时间的菌株具有相同的带型。结论 应加强食品中 *S. aureus* 的监测分析,为其引起的食物中毒的预防和控制提供科学依据。

**关键词:**金黄色葡萄球菌;肠毒素基因;脉冲场凝胶电泳;食源性致病菌

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)05-0417-04

**Distribution of enterotoxin genes and genotyping  
in *Staphylococcus aureus* isolated from food**

Zhang Hongzhi, Zhu Zhaoqin, Chen Haili, Cui Lin, Liu Yue, Sun Shuangfu, Gu Qifang  
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract: Objective** To obtain an overview of distribution of enterotoxin genes and epidemic characteristics of *S. aureus* through gene testing and genotyping of isolates from food in Shanghai from 2006 to 2009. **Methods** Enterotoxin genes in 49 *S. aureus* strains from food were tested by PCR including five traditional enterotoxin genes (SEA-SEE) and four newly discovered genes (SEG-SEJ). Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was used for genotyping. **Results** The total detection rate of enterotoxin genes was 38.8%. And the traditional enterotoxin genes SEA and SEC were detected, 93.8% of which belonged to SEC. The newly discovered enterotoxin genes including SEG, SEI, SEJ and SEH were also detected. The method of PFGE successfully classified 44 isolates into 28 gene types with 5 isolates indeterminable. **Conclusion** A wide variety of *S. aureus* genomic types could contaminate food and lead to food poisoning. The surveillance and ongoing monitoring of *S. aureus* should be strengthened to provide scientific basis for food poisoning prevention and control.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; enterotoxin genes; pulse field gel electrophoresis; foodborne pathogens

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)是革兰阳性、耐盐生长的致病菌,是仅次于沙门菌和副溶血性弧菌的第三大食源性致病菌<sup>[1]</sup>,在美国和加拿大由 *S. aureus* 引发的食物中毒事件分别占到了33%和45%<sup>[2]</sup>,在我国,近几年发生的微生物性食物中毒病例中,20%~25%是由 *S. aureus* 引起的<sup>[1]</sup>。目前,国内外对 *S. aureus* 引起的食物中毒及相关菌株的分析研究多集中在肠毒素的检测分析。肠毒素是 *S. aureus* 产生的一种耐热外毒素,传统的肠毒素有5种,分别是SEA、SEB、SEC、SED和SEE<sup>[3]</sup>。随

着 *S. aureus* 全基因组测序及新型毒素基因功能的探索,致病特征逐渐明确的肠毒素有SEG、SEH、SEI和SEJ<sup>[4]</sup>,这些新型肠毒素均具有超抗原特性,在引起食物中毒的金黄色葡萄球菌中均可检测到<sup>[5]</sup>。

本研究分析了49株2006—2009年间上海市从食品中分离的 *S. aureus*,利用PCR法检测传统肠毒素及新型肠毒素,旨在了解这些肠毒素在食品中的分布情况,为预防和控制 *S. aureus* 引起的食物中毒提供依据。本研究还采用脉冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)法对49株食品分离 *S. aureus* 进行基因分型比较,探讨近几年上海市食品中 *S. aureus* 的分子生物学流行规律,为食物中毒菌株的溯源和流行病学调查提供科学依据。

收稿日期:2012-05-16

作者简介:张红芝 女 博士 研究方向为食品微生物

通信作者:顾其芳 女 副主任技师 研究方向为食品微生物

E-mail: qifangu@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源

49株金黄色葡萄球菌均为2006—2009年由本实验室从食品中分离。PFGE分析用分子质量标准的参考菌株为沙门菌H9812,是国际病原菌实验室监测网络PulseNet的标准菌株。

### 1.2 仪器与主要试剂

Bio-Rad CHEF Mapper XA型脉冲场电泳仪、Bio-Rad Gel Doc XR凝胶图像分析系统、Bio Rad PCR扩增仪;API细菌鉴定系统。

溶葡萄球菌素酶(L-7386,美国Sigma公司);SmaI内切酶、Taq酶(大连宝生物工程有限公司);蛋白酶K(上海Sangon公司);Seakem Gold琼脂糖。

### 1.3 *S. aureus* 的鉴定

菌株分离鉴定参照国标GB/T 4789.10—2010的规定:经革兰染色,镜检观察细菌的染色特性;血浆凝固酶实验;API细菌鉴定系统确认。

### 1.4 PCR法检测肠毒素基因

取分离平板培养基上的金黄色葡萄球菌单菌落,接种脑心浸液培养基,37℃震荡培养24h。取增菌液100μl,12000r/min离心5min,弃上清液,加入100μl细菌裂解液,振荡混匀,置100℃水浴10min,10000r/min离心2min,取上清液作为肠毒素基因PCR检测模板。分离菌株检测肠毒素基因SEA、SEB、SEC、SED、SEE、SEG、SEH、SEI、SEJ,PCR反应体系为25μl,包含模板DNA1μl,上下游引物各(10pmol/μl)1μl,Taq酶反应液12.5μl,水9.5μl。肠毒素基因引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列见表1。PCR反应程序为:95℃变性5min,再30次循环即95℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸1min,最后72℃延伸10min。PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳。电泳后在凝胶成像系统中成像。

### 1.5 PFGE分型

按美国CDC单核增生李斯特菌的PFGE标准操作程序(<http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols.htm>)进行,用SmaI进行酶切,其他操作均按照标准方法进行。

#### 1.5.1 细菌培养

将半固体保存的*S. aureus*接种于绵羊血平板,37℃培养16~18h,取适量菌落于1.5ml CSB中,混匀后A600nm比浊,调整OD值到0.9~1.2之间,取200μl菌液于1.5ml eppendorf管中37℃保温10min。

#### 1.5.2 细菌裂解与酶切

用1×TE制备1% SeaKem Gold:1% SDS放置于56℃水浴中预热;取4μl溶葡萄球菌素酶(1mg/ml,溶于0.1M NaCl)加入200μl准备好的

金胶中,再加入到200μl制备的菌液中,轻轻混匀后取适量加入模具,置室温冷却;制备好的小胶块于5ml裂解液中裂解2h以上,用1×TE洗5次,每次约10~15min,裂解与洗涤均在54℃摇床170r/min中进行;取约2mm宽的小胶条于200μl SmaI(10U/μl)酶切体系,30℃酶切3~4h;将小胶条包埋于1% Seakem Gold琼脂糖(用0.5×TBE配制)中,电泳。Marker H9812处理;200μl菌液加入10μl蛋白酶K(20mg/ml)与等量1% Seakem Gold;1% SDS(1×TE配制)混合制备小胶条;置于5ml CLB/蛋白酶K(5ml CLB/25μl蛋白酶K)混合液中54℃摇床(170r/min)裂解2h;洗胶后SmaI 30℃酶切3~4h。

#### 1.5.3 电泳条件

脉冲电泳起始转换时间为5s,最后转换时间为40s;电压为6V/cm;角度120°;电泳温度14℃,电泳缓冲液为0.5×TBE,电泳时间19h。

#### 1.5.4 图像的获取与分析

电泳后用1μg/ml溴化乙锭染色30min,置纯水中脱色30min,读胶仪成像。用BioNumerics V4.0软件(Applied Maths BVBA, Belgium)进行聚类分析,聚类图类型根据非加权配对算术平均法UPGMA构建。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primer used in the assays			
基因	引物	序列(5'—3')	扩增片段(bp)
sea	FP	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	520
	RP	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	
seb	FP	ATGTAATTTTGATATTCGCAGTG	643
	RP	TGCAGGCATCATATCATAACCA	
sec	FP	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	283
	RP	TGCAGCCATCATATCATAACCA	
sed	FP	GTGGTAAAATAGATAGGACTGC	283
	RP	ATATGAAGGTGCTCTGTGG	
see	FP	TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC	170
	RP	CTCTTTGCACCTTACCGC	
seg	FP	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	327
	RP	CCAAGTGATTGTCTATTGTCCG	
sei	FP	CAACTCGAATTTTCAACAGGTAC	465
	RP	CAGGCAGTCCATCTCCTG	
seh	FP	CAACTGCTGATTAGCTCAG	360
	RP	GTCGAATGAGTAATCTCTACG	
sei	FP	CAACTCGAATTTTCAACAGGTAC	465
	RP	CAGGCAGTCCATCTCCTG	
sej	FP	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG	142
	RP	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	

## 2 结果

### 2.1 金黄色葡萄球菌食品分离株中肠毒素基因的分布

PCR法检测了2006—2009年上海地区分离自

食品的金黄色葡萄球菌中肠毒素基因 SEA-SEE, SEG-SEJ。PCR 检测结果见图 1。

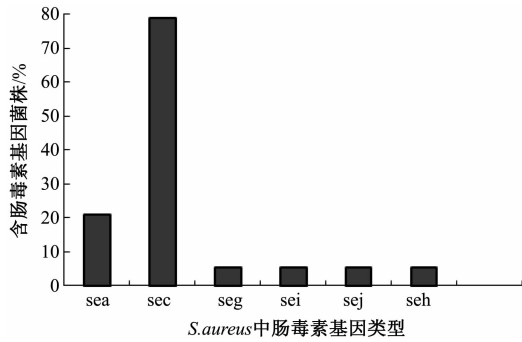


图 1 金黄色葡萄球菌食品分离株中肠毒素的分布情况  
Figure 1 The distribution of enterotoxin genes of *S. aureus* isolated from food

检测结果显示,49 株金黄色葡萄球菌中有 19 株含有肠毒素基因,占 38.8%。在这些含有肠毒素基因的菌株中,4 株含有两种肠毒素基因,3 株含有 SEA 和 SEC,1 株含有 SEG 和 SEI。16 株含有传统肠毒素基因 SEA 和 SEC,除 1 株含有 SEA 外,其余 15 株菌均含有 SEC,占 93.8%。在这些食品中检出的新型肠毒素基因较传统肠毒素基因少,只有 1 株菌含有 SEH,1 株菌含有 SEJ,1 株菌含有 SEG 和 SEI。

图 2 显示这些含有肠毒素基因的菌株来自多种食品,包括猪肉类,鸡肉类,鸭肉类,牛肉类以及奶类,提示受到金黄色葡萄球菌污染的各种肉类及奶类制品有较高的潜在危险。

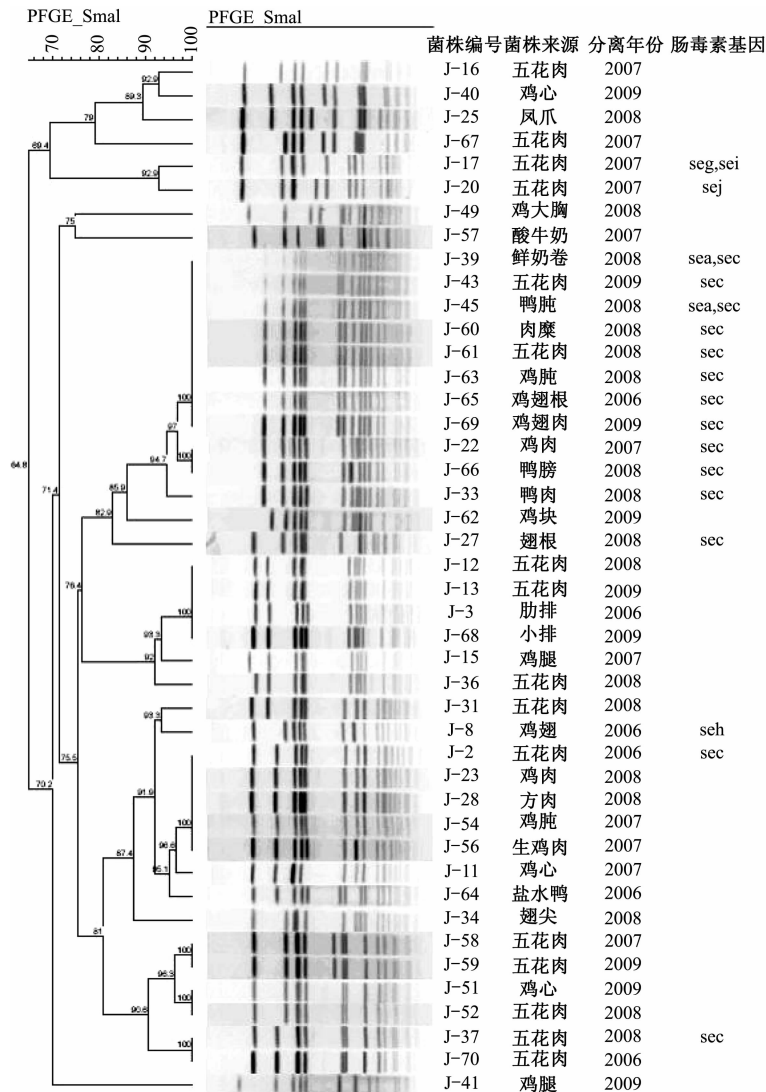


图 2 上海市食品中分离的金黄色葡萄球菌 SmaI 酶切脉冲场凝胶电泳分型聚类图  
Figure 2 Dendrogram showing the level of similarity among SmaI digested macrorestriction patterns of *S. aureus* isolated from food in Shanghai

## 2.2 脉冲场凝胶电泳

49 株分离自食品的金黄色葡萄球菌经 SmaI 切割后制胶进行 PFGE 分析,其中有 5 株 *S. aureus* 只

出现一条带,不能被分型;其余 44 株 *S. aureus* 被分为 28 个型别(图 2),其中最多的 1 个型别含有 8 株菌;1 个型别含有 5 株菌,1 个型别含有 3 株菌,3 个

型别含有2株菌,其余型别均含有1株菌,提示其带型特点表现为多样性,没有优势克隆群存在。其次,某些菌株虽然分离自不同时间,但具有相同带型,如在具有相同带型的8株菌中,菌株J-65分离自2006年;J-39、J-45、J-60、J-61和J-63分离自2008年;J-43和J-69分离自2009年,提示相同克隆群的菌株在不同时间持续存在。

### 3 讨论

从本研究可知,2006—2009年间上海市自食品分离的*S. aureus*中检测出两种传统肠毒素和3种新型肠毒素,以传统肠毒素C型为主。这与同时期我国其他省市的报道有所不同,浙江地区食品中分离的*S. aureus*中没有检测到C型肠毒素<sup>[6]</sup>;武汉和广东地区食品中分离的*S. aureus*均以A型肠毒素为主<sup>[7-8]</sup>,提示不同地区食品分离株各型的肠毒素基因分布有区别,这可能与菌株的来源差别有关。图2还显示产生肠毒素的*S. aureus*来源于各种肉类及奶制品,推测不同食品的分离株各型肠毒素基因的总水平差别不大,因此要加强监管,预防和控制由其引起的食物中毒。

本研究中检测出了新型肠毒素SEG,SEI,SEH和SEJ,这些新型肠毒素基因都具有超抗原性<sup>[9]</sup>,研究发现5%的*S. aureus*引起的食物中毒并不是由传统肠毒素引起的,进一步的研究检测出了新型肠毒素。新型肠毒素的出现使得金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒的几率增加了,Gaud<sup>[10]</sup>用PCR检测肠毒素SEG,SEH和SEJ基因时发现,这些毒素出现的频率可达57%。病人分离的*S. aureus*中新型肠毒素的比例要高于传统肠毒素,且大部分同时携带多种肠毒素<sup>[11]</sup>,这与实验中食品分离株以传统肠毒素为主不同。在49株食品分离株中只检测到1株菌含有新型肠毒素基因SEG和SEI,而病人分离株中这两个基因的含量可高达91.6%和55%<sup>[12-13]</sup>。因为SEG和SEI基因在Sap B毒力岛egc基因簇上,有研究报告含egc基因簇的金黄色葡萄球菌感染性较强<sup>[14]</sup>,因此病人分离株中这两个基因的比例相对较高。

PFGE分型是监测食源性病原菌暴发流行的非常重要的手段之一,能较好地反映出病原菌的遗传基因相关性,有效追查传染源,为流行病学调查提供理论依据。本研究应用PFGE分型技术对49株*S. aureus*进行了分型比较研究,结果有5株*S. aureus*不能被分型,此种情况在我国只有一次报道<sup>[12]</sup>。对44株能分型的菌株型别进行分析,结果表明44株*S. aureus*的带型相似度低,分为28个型别,表明了

*S. aureus*基因型的多样性,这也提示由食物引起感染导致大规模食物中毒暴发流行的概率相对较小,这与以前的报道是一致的<sup>[15]</sup>。进一步加强食品卫生的监管,才能有效控制食物中毒发生。

### 参考文献

- [1] 卫生部办公厅关于2007年全国食物中毒报告情况的通报[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(3):285-288.
- [2] TIRADO C,SCHIMDT K. WHO surveillance programe for control of food-borne infections and intoxications; preliminary results and trends across greater Europe[J]. Infect,2001,43:80-84.
- [3] CAPUCINE L,SYLVIE P,FRANCOISE D,et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the *Staphylococcus enterotoxin genes sea to sej*[J]. Molecular and Cellular Probes,2003,17:227-235.
- [4] BALABAN N,RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins[J]. J Food Microbiol,2001,61:1-10.
- [5] OMOE K,HU D L,TAKAHASHI-OMOEO H,et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates[J]. FEMS Microbiol Lett,2005,246:191-198.
- [6] 李毅,章乐怡,李小春,等. 食品中金黄色葡萄球菌及肠毒素检测分析报告[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(10):2370-2372.
- [7] 陈智,江元山,熊燕,等. 金黄色葡萄球菌食物中毒分离株毒素基因的PCR分析[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(1):21-23.
- [8] 贺连华,王瑞端,陈妙玲,等. 食品中金黄色葡萄球菌的肠毒素检测及耐药性[J]. 职业与健康,2006(22):1173-1174.
- [9] JACEK N,ANNA D,JAROSLAW B,et al. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food[J]. Int J Food Microbiol,2006,108:36-41.
- [10] GAUD O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France[J]. Food Microbiol,2002,77(1-2):61-70.
- [11] 张严峻,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):33-35.
- [12] 姚咏明,盛志勇. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因与多器官功能障碍综合征[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(9):517-519.
- [13] BECKER K,FREIDRIEH A W,LUBRITZ G,et al. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens[J]. J Clin Microbiol,2003,41(4):1434-1439.
- [14] LAWRYNOWICZ-PACIOREK M,KOCHMAN M,PIEKARSKA K,et al. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples[J]. Food Microbiol,2007,17(3):319-323.
- [15] 汪永禄,王多春,郑锦绣,等. 马鞍山市金黄色葡萄球菌分子特征与耐药性分析[J]. 中国预防医学杂志,2011(10):826-829.