

拭中分离出 1 株。但是据美国 CDC 报道,2007 年,美国曾发生过由旺兹沃斯沙门菌引起的一次暴发,这次暴发涉及到美国 17 个州,共有 65 个病例,其中有 77% 的病例出现了血样便。所以,不能忽视这个罕见血清型沙门菌对公共卫生的威胁,防止食品入侵或病例输入,通过对罕见沙门菌血清型的持续监测,对菌株进行耐药性的、分子分型的研究,不断完善和发展以 PFGE 聚类分析为基础的相关数据库,以监控和预警罕见血清型沙门菌型流行,对于公共卫生具有重大的意义。

## 参考文献

- [ 1 ] SOTIR M J, EWALD G, KIMURA A C, et al. Outbreak of Salmonella Wandsworth and Typhimurium infections in infants and toddlers traced to a commercial vegetable-coated snack food [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2009, 28(12): 1041-1046.
- [ 2 ] 美国临床实验室标准化协会. 抗微生物药物敏感性试验执行标准[S]. 美国·宾西法尼亚·韦恩: 第 16 版信息增刊(M100-

- S16), 2006, 26(3): 1-78.
- [ 3 ] CDC. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of escherichia coli O157: H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigellosis sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis[S].
- [ 4 ] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [ 5 ] 李郁, 焦新安, 魏建忠, 等. 屠宰生猪沙门氏菌分离株的血清型和药物感受性分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(1): 67-70.
- [ 6 ] 施益民, 张满珍, 巢国祥. 从健康体检中检出旺兹沃斯沙门菌[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1989, 5(5): 55.
- [ 7 ] 李端, 王琪, 万水. 南昌市检出旺兹沃斯沙门菌[J]. *中华预防医学杂志*, 1997, 31(6): 345.
- [ 8 ] 蒋兴祥, 张行燕. 从纯蛇粉制品检出一株罕见的旺兹沃思沙门氏菌的调查分析[J]. *食品与健康*, 1996, 3(8): 51.
- [ 9 ] 李红星, 杜浩森, 李康, 等. 商丘市 2006—2010 年沙门菌感染性腹泻监测结果分析[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(17): 3558-3560.

## 研究报告

# 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因型分布研究

沈玄艺, 宋启发, 徐景野, 朱国良, 章丹阳

(浙江省宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

**摘要:**目的 采用 PCR 法扩增食源性金黄色葡萄球菌中肠毒素基因以了解该菌肠毒素基因携带情况, 比较食物中毒和食品监测来源菌株中肠毒素基因检出率差异。方法 合成 sea、seb、sec、sed 和 see 五种肠毒素基因特异性引物, 用常规 PCR 方法扩增食物中毒和食品监测来源菌株中各自肠毒素基因, 同时采用 mini-VIDAS 检测食物中毒来源菌株中肠毒素。结果 110 株菌株中有 30 株检出肠毒素基因, 检出率为 27.3%, 肠毒素基因阳性菌株均只检出 1 种肠毒素基因。其中来自 2 起食物中毒的 14 株菌株均检出 seb 型肠毒素和相关基因, 检出率为 100%。来源于食品监测样本的 96 株菌株中有 16 株检出肠毒素基因, 检出率为 16.7%, 包括 sea 型 4 株、seb 型 2 株、sec 型 4 株、sed 型 6 株。结论 在宁波市食品监测中所分离的金黄色葡萄球菌所携带的肠毒素基因主要有 sea、seb、sec 和 sed 四型, 而 seb 型肠毒素是引起金黄色葡萄球菌肠毒素所致食物中毒的主要因素。

**关键词:**金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 基因; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)05-0427-03

## Study on the distribution of enterotoxin genotypes in foodborne *Staphylococcus aureus*

Shen Xuanyi, Song Qifa, Xu Jingye, Zhu Guoliang, Zhang Danyang

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

**Abstract: Objective** To study and compare the prevalence of enterotoxin genes in foodborne *Staphylococcus aureus*

收稿日期: 2012-05-01

作者简介: 沈玄艺 女 主管技师 研究方向为卫生微生物检验

通信作者: 宋启发 男 副主任技师 研究方向为细菌基因组学 E-mail: songqf@nbcdc.org.cn

isolates from food-poisoning and food inspection. **Methods** Isolates from food-poisoning and food inspection were tested by PCR method with five pairs of primers for *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes. Enterotoxin was analyzed in isolates from food-poisoning isolates with mini-VIDAS. **Results** 30 out of 110 samples were enterotoxin gene positive (27.3%, 30/110) and only one type of enterotoxin gene existed in all positive samples. Both enterotoxin and relative gene of *seb* were found in 14 isolates from two food-poisoning events (100%, 14/14). 16 isolates from 96 food inspection samples were enterotoxin gene positive (16.7%, 16/96), including 4 strains of *sea*, 2 *seb*, 4 *sec* and 6 *sed*. **Conclusion** Enterotoxin genes of *sea*, *seb*, *sec* and *sed* were found in *Staphylococcus aureus* isolates in Ningbo. Enterotoxin of *seb* is the major factor of food-poisoning caused by *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; enterotoxins; gene; foodborne pathogens; food safety

金黄色葡萄球菌广泛分布于自然界中,易导致食品受其污染,是一种重要的食源性致病菌<sup>[1]</sup>。其主要致病因子包括肠毒素和毒性休克综合征毒素-1 (TSST-1)等,属于细菌性化脓性毒素超抗原家族 (PTSAgs: family of bacterial pyrogenic toxin superantigens)<sup>[2-3]</sup>,其中金黄色葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal enterotoxin, SE) 为一组可溶性单链蛋白,是该菌分泌的外毒素,在结构和功能上有一定相似性。经典 SE 分为 *sea*、*seb*、*sec*、*sed* 和 *see* 共五种类别<sup>[4]</sup>,近年也陆续发现新的类型 *seg* 和 *sei* 等<sup>[5]</sup>,是引起食物中毒的主要物质,中毒症状主要表现为呕吐和腹泻。*sea* 和 *sed* 最常见,不同肠毒素致病性存在差异,其中 *sea* 型致病性最强<sup>[6]</sup>。毒素蛋白由毒素相关基因编码,因此采用 PCR 方法检测相关毒素基因是评价细菌毒力的可靠方法<sup>[7]</sup>。本研究通过 PCR 方法检测食源性金黄色葡萄球菌携带相关肠毒素基因和 mini-VIDAS 检测引起食物中毒菌株的肠毒素,以了解相关毒素基因分布,获得产毒株的致病性情况,为中毒治疗和预防提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

110 株金黄色葡萄球菌来源为食物中毒和食品监测样品,SCDLP 增菌后用金黄色葡萄球菌显色平板分离培养后按常规方法鉴定,保存于 -70 °C 含 30% 甘油肉汤中。

### 1.2 PCR 引物

由上海塞百盛生物工程公司合成,见表 1。

### 1.3 常用试剂

基因组提取试剂、PCR 试剂、DNA marker 等均为大连 TaKaRa 公司产品,mini-VIDAS 金黄色葡萄球菌肠毒素检测试剂购自生物梅里埃。

### 1.4 PCR 扩增

用基因组提取试剂盒提取基因组模版,分别用 *sea*、*seb*、*sec*、*sed* 和 *see* 五对引物扩增各自目的基因,反应体系为:50 μl 总体积,10 × PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L) 5 μl,引物各 40 pmol, dNTP 各

表 1 扩增金黄色葡萄球菌肠毒素基因所用引物和相关产物

引物名称	序列	产物长度 (bp)	参照 GenBank 号
<i>sea</i> sense	5'- TGCTGCTTATATGTTATC-3'	217	DQ641659
	antisense:5'- TCTTGCTGAAGATCCAAC-3'		
<i>seb</i> sense	5'-AAG GAC ACTAAGTTAGGGAA-3'	443	AY852244
	antisense:5'- ATCATGTCATACCAAAAAGCT-3'		
<i>sec</i> sense	5'-CTCAAGAACTAGACATAAAAAGTAGG-3'	271	AM778682.1
	antisense:5'-TCAAAATCGGATTAACATTATCC-3'		
<i>sed</i> sense	5'- ATAGTAGTTTACCTGGGTCG-3'	429	M94872.1
	antisense:5'- AGTGTCTTGATTAGCGTTT-3'		
<i>see</i> sense	5'- CTTGGTTCAAAAAGATGCTAC-3'	383	M21319.1
	antisense:5'- AAATCATAACTTACCGTGA-3'		

10 μmol, Taq 酶 2.5 单位,模板 2 μl。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。产物 1% 琼脂糖电泳分离,溴乙锭染色判断结果。

### 1.5 金黄色葡萄球菌肠毒素检测

将金黄色葡萄球菌菌株接种于 7.5% NaCl 肉汤中 37 °C 震荡培养过夜,将培养液以 5 000 r/min 离心 5 min 沉淀,取上清液采用 mini-VIDAS 荧光酶联免疫分析方法检测其中的金黄色葡萄球菌肠毒素。

## 2 结果

mini-VIDAS 荧光酶联免疫法检测食物中毒来源的 14 株菌株的金黄色葡萄球菌肠毒素结果均为阳性。110 株金黄色葡萄球菌中不同肠毒素基因检测结果分布见表 2,不同来源肠毒素基因检出率结果见表 3。

表 2 110 株金黄色葡萄球菌中不同肠毒素基因检测结果分布  
Table 2 Result distribution of various enterotoxin genes in 110 *Staphylococcus aureus* isolates

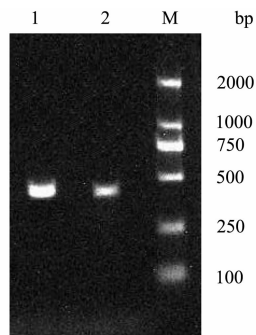
肠毒素基因	检出数量	检出率 (%)
<i>sea</i>	4	3.6
<i>seb</i>	16	14.5
<i>sec</i>	4	3.6
<i>sed</i>	6	5.4
<i>see</i>	0	0
总计	30	27.3

表3 不同来源金黄色葡萄球菌肠毒素基因检出率

来源	肠毒素基因检出数量	检出百分数(%)
食物中毒 14 株	14	100.0
食品监测样品 96 株	16	16.7
总计 110 株	30	27.3

### 3 讨论

在 110 株菌株中,30 株肠毒素基因检测阳性,比率为 27.3%,所有阳性菌株中均只检出 1 种肠毒素基因,包括 sea 型 4 株(3.6%)、seb 型 16 株(14.5%)、sec 型 4 株(3.6%)和 sed 型 6 株(5.4%)四种类型,检出率低于有关文献报道<sup>[8]</sup>,原因有待探讨。30 株含肠毒素基因菌株,14 株来自两起食物中毒,采用 mini-VIDAS 方法检测肠毒素均为阳性,PCR 扩增均为 seb 型肠毒素基因(图 1),食物中毒来源菌株肠毒素和相关基因检出率均为 100%,与临床表现高度一致,提示肠毒素基因携带情况是引起食物中毒的重要因素,检测肠毒素基因可以用于评价致病风险。来源于食品监测样本的 96 株菌株检出 16 株肠毒素基因阳性,检出率



M: DNA marker; 1-2: 肠毒素seb基因阳性(443bp)

图1 金黄色葡萄球菌部分肠毒素基因 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR fragments of enterotoxin genes amplified from *Staphylococcus aureus*

16.7%,显示在环境分离株肠毒素基因检出率明显低于中毒分离株( $P < 0.01$ ),包括 sea 型 4 株、seb 型 2 株、sec 型 4 株和 sed 型 6 株四种类型。不同肠毒素具有独特的生物学活性,因此对人的致病性存在差异,如 sea 为超抗原,seb 具有丝裂原活性等<sup>[6]</sup>,采用 PCR 方法对食源性金黄色葡萄球菌分离株中肠毒素基因进行分型,方法快速可靠,可以弥补 mini-VIDAS 肠毒素检测方法无法进行分型的不足,对于评估金黄色葡萄球菌的致病性和疾病预后具有重要意义。

### 参考文献

- [1] BERGDOLL M S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M P, editor. Foodborne bacterial pathogens [M]. New York, N. Y: Marcel Dekker, 1989:463-523.
- [2] DINGES M M, ORWIN P M, SCHLIEVERT P M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13:16-34.
- [3] McCORMICK J K, YARWOOD J M, SCHLIEVERT P M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update[J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55:77-104.
- [4] BERGDOLL M S, ROBBINS R N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins[J]. J Milk Food Technol, 1973, 36: 610-612.
- [5] MUNSON S H, TREMAINE M T, BETELEY M J, et al. Identification and characterization of Staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Immun, 1998, 66(7):3337-3348.
- [6] BETLEY M J, BORST D W, REGASSA L B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology[J]. Chem Immunol, 1992, 55:1-35.
- [7] McLAUHLIN J, NARAYANAN G L, MITHANI V, et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction [J]. J Food Prot, 2000, 63:479-488.
- [8] 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.