

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌肠毒素快速分型体系的建立及应用^{*}

王 丽¹, 王 冰², 黎桂莲², 林一曼², 贺连华², 石晓路², 吴平芳², 陈妙玲²

(1. 广东省深圳市妇幼保健院 518048; 2. 广东省深圳市疾病预防控制中心 518020)

摘 要:目的 建立 SYBR-Green 荧光 PCR 体系金黄色葡萄球菌肠毒素快速分型体系, 应用于金黄色葡萄球菌食物中毒和食品风险监测快速诊断。方法 根据 GenBank 公布的金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E 基因的保守序列设计特异性引物, 分别建立 SYBR-Green 荧光 PCR 体系。应用该系列体系检测 185 株金黄色葡萄球菌野生株的肠毒素基因 A~E 型。结果 建立的 SYBR-Green 荧光 PCR 系列体系其 DNA 灵敏度为 1.34~2.80 ng/ μ L, 菌液灵敏度为 46~96 CFU/mL; 用以检测 185 株金黄色葡萄球菌的肠毒素基因 A~E 型, 携带一种基因型的为 58.38%, 同时携带两种以上毒素基因占 4.86%。结论 建立的荧光 PCR 反应体系快速、灵敏度高、特异性强, 能应用于金黄色葡萄球菌肠毒素基因的准确分型, 对食物中毒诊断和食品风险监测很有意义。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 肠毒素类; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)02-0154-03

Establish and apply a rapid detection system of Staphylococcus aureus enterotoxin genes

Wang Li¹, Wang Bing², Li Guilian², Lin Yiman², He Lianhua², Shi Xiaolu², Wu Pingfang², Chen Miaoling²

(1. Shenzhen Maternity and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518048, China;

2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: **Objective** To establish a new rapid and highly sensitive detection system for Staphylococcus aureus (S. aureus) enterotoxin genes using SYBR green real-time PCR and its application of rapid diagnosis for alimentary toxicosis caused by S. aureus and related food risks. **Methods** Primers specific for S. aureus enterotoxin A, B, C, D and E genes were designed according to GenBank data. PCR systems based on SYBR-Green were constructed for each gene and performed for the detection of A-E genes in 185 wild strains of S. aureus. **Results** For the real time PCR assay, the DNA sensitivity achieved 1.34-2.80 ng/ μ L and the bacterial solution sensitivity was 46-96 CFU/mL. 58.38% of the 185 wild strains of S. aureus were with single gene type of A-E genes, and 4.86% were with tow type of toxin genes, when being detected by the constructed PCR systems. **Conclusion** A rapid PCR system with high sensitivity and specificity was successfully established, and could be used for the accurate typing of S. aureus enterotoxin genes, for the diagnosis of alimentary toxicosis and for the monitoring of food risks.

Key words: staphylococcus aureus; enterotoxins; polymerase chain reaction

金黄色葡萄球菌是人类化脓感染中最常见的病原菌, 可引起局部化脓感染, 也可引起肺炎、伪膜性肠炎甚至全身感染等疾病^[1]。金黄色葡萄球菌也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一^[2]。在美国, 大约每年超过 18.5 万人发生金黄色葡萄球菌食物中毒, 其中约 1 750 人住院, 每年损失约 15 亿美元。在欧盟, 1993~1998 年共发生了 926 起报告的金黄色葡萄球菌食物中毒, 占食源性疾病的 4.5%。日本的调查结果表明, 平均 32.5% 的食品存在金黄色葡萄球菌的污染^[3-4]。近年来, 中国由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件在全国已占据第四位^[5]。本市 2002~2007 年共发生 35 起确诊由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒, 食品污染物监测数据显示, 平均有 5% 的食品存在金黄色葡萄球菌污染, 而在散装熟食肉制品和豆制品中, 这一比例则高达 30%^[6]。据中国食品污染物和食源性疾病监测网 2003~2005 年数据显示, 微生物食源性疾病由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的占第 4 位, 其中以 A 型肠毒素引起的食物中毒居多, B 型次之, C 型及 D 型少见。目前, 金黄色葡萄球菌肠毒素的检测方法主要依靠免疫血清学方法, 该技术需要细菌培养和制备肠毒素, 实验周期长, 操作繁琐, 使得免疫

血清学方法在食品卫生鉴定时受到限制。因此, 研究快速、灵敏、简便的金黄色葡萄球菌肠毒素检测和分型技术, 对于由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒临床诊断和预防该菌引起的食物中毒均有重要意义。本研究根据 GenBank 公布的金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E 基因的保守序列设计特异性引物, 加入荧光染料, 分别建立实时 SYBR-Green 荧光 PCR 体系, 并确定体系的特异性及灵敏度。应用该系列 SYBR-Green 荧光 PCR 体系检测 185 株食源性金黄色葡萄球菌临床分离的肠毒素基因 A~E 型, 了解本市食物中毒和食品污染物中金黄色葡萄球菌携带肠毒素基因情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 临床分离金黄色葡萄球菌株共 185 株, 其中食品来源菌株 81 株, 来源于深圳市食品污染物监测网络, 主要根据年份和样品类别从菌种库中分层抽选, 覆盖生鲜类、刺身类、熟食类、豆制品等。食物中毒来源菌株 104 株, 来源于深圳市食物中毒监测网络, 主要从患者肛拭子、粪便和剩余食品中分离。实验用标准菌株: 金黄色葡萄球菌(肠毒素 A、B、C、D、E

^{*} 基金项目: 国家科技“十一五”重大专项《病原体网络化监测技术研究》、深圳市科技局立项项目(201102103)。△ 通讯作者, E-mail:

型各一支)、甲型副伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、丙型副伤寒沙门菌、伤寒沙门菌、蜡样芽孢杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、肉毒梭菌、产芽孢梭菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、产单核李斯特菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、黏质沙雷菌、鲍曼志贺菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、宋内志贺菌、粪链球菌、乙型溶血性链球菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、小肠结肠耶尔森菌

1.1.2 试剂 CM1135 脑心肉汤培养基(购自英国 OXOID 公司)、SYBR-Green 预混液购自宝生物工程(大连)有限公司、PRF 金黄色葡萄球菌确认平板(购自法国生物梅里埃公司)

1.1.3 仪器设备 荧光 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,型号:7500)、电泳仪\电泳槽(美国 Bio-rad 公司,型号:WIDE-MINI-SUBCED GTSYS)、电恒温培养箱(广东韶关科力仪器公司,型号:PYX-2805-A)、台式离心机(德国贝克曼公司,型号:SIG-MAI-13)、超微量分光光度计(美国基因有限公司,型号:ND-1000)

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离和鉴定 所有分离的野生菌株都已按照国标 GB/T4789.10-2008 进行检测,鉴定为金黄色葡萄球菌。

1.2.2 模板提取 取 1 mL 菌液,以 8 000 r/min 离心 5 min,弃上清;用 200 μL PBS 将沉淀悬浮,加入 20 μL 蛋白酶 K;加入 20 μL Buffer AL,混匀,56 ℃ 孵育 10 min;加入 200 μL 无水乙醇(98%),混匀;将混合液转移到 QIAamp 螺旋柱,置于 2 mL 收集管,以 8 000 r/min 离心 1 min,弃去含滤液的收集管;QIAamp 螺旋柱再置于 2 mL 收集管,加入 500 μL Buffer AW1,以 8 000 r/min 离心 1 min,弃去含滤液的收集管;QIAamp 螺旋柱再置于 2 mL 收集管,加入 500 μL Buffer AW2,以 14 000 r/min 离心 3 min,弃去含滤液的收集管;QIAamp 螺旋柱再置于 2 mL EP 管,加入 200 μL Buffer AE,室温孵育 1 min,以 8 000 r/min 离心 1 min,DNA 在 2 mL EP 管中。

1.2.3 SYBR-Green 荧光 PCR 体系的建立

1.2.3.1 引物的设计 根据 GenBank 公布的金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E 基因的保守序列进行比较分析,用 Primer5.0 软件设计特异性引物。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,见表 1。

表 1 引物及其序列

基因	引物	序列(5'-3')	目的片段长度(bp)
SET-A	SetA-F	GGATTGTTATGATAAAATATAAAGGGAAGAAA	412
	SetA-R	GTTATTATCTTAATCGTTTCTATATATTCTTAATAGT	—
SET-B	SetB-F	AGAATAAATACATTTTAGCTGAAGATAAAATACG	520
	SetB-R	TCGTAAGAATCTTCAATAAACTTCCATCT	—
SET-C	SetC-F	AGAGAAGTACAATTTAGCAAAAGATG	356
	SetC-R	AAGGTGGACACACTTTTCTATCTTC	—
SET-D	SetD-F	TTTAATATCTCCTTACTAGTTTGG	378
	SetD-R	CAATTAATGCCACCATAA	278
SET-E	SetE-E	TTAAAACAAGCAAATAGATAAAG	267
	SetE-R	TAACTTACCGTGGACCC	178

—:无数据。

1.2.3.2 荧光 PCR 反应体系 反应总体积为 20 μL,内含有 SYBR Premix EXTM(2×) 10 μL;Primer F 0.4 μL;premer R 0.4 μL;Rox(荧光染料)0.4 μL;DNA 模板 2 μL;加无菌水到 20 μL。

1.2.3.3 荧光 PCR 反应条件 95 ℃ 32 s 1 cycle(预变性);95 ℃ 5 s(变性),60 ℃ 34 s(退火),72 ℃ 1 min(延伸),40 cycles;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,1 cycle(熔解曲线)。

1.2.3.4 特异性检测实验 抽提所列标准菌株的 DNA,用建立的 SYBR-Green 荧光 PCR 体系分别进行肠毒素 A、B、C、D、E 基因的扩增。

1.2.3.5 灵敏度分析实验 (1)菌液灵敏度分析 5 种金黄色葡萄球菌标准菌株分别增菌过夜后,对增菌液进行 10 倍稀释,共做 10 个稀释度,然后依次取 10 个稀释度的 1 mL 菌液进行实时荧光 PCR 反应,按 Ct 值小于或等于 33 且在 81 ℃ 附近有明显熔解曲线判为阳性,否则判为阴性。同时参照 GB/T4789.2-2003 做细菌总数计数,首次出现阴性的反应管其对应前一个稀释度即为该体系的菌液灵敏度。(2)DNA 灵敏度分析 5 种金黄色葡萄球菌标准菌株分别增菌过夜后,用试剂盒对增菌液进行 DNA 抽提,用分光光度仪检测抽提液的 DNA 浓度,然后分别倍比稀释系列梯度进行荧光 PCR 检测,按 Ct 小于或等于 33 且在 81 ℃ 附近有明显熔解曲线判为阳性,否则判为阴性。首次出现阴性的反应管其对应前一个 DNA 浓度

即为该体系的 DNA 灵敏度。

1.2.3.6 SYBR-Green 荧光 PCR 反应体系的应用 用所建立 SYBR-Green 荧光 PCR 反应体系对本市 185 株菌株分别进行金黄色葡萄球菌肠毒素基因 A、B、C、D、E 检测。

2 结 果

2.1 特异性实验结果 金黄色葡萄球菌分型标准株均有相应的阳性扩增,其他标准菌株均为阴性扩增,特异性为 100%,见图 1、2。

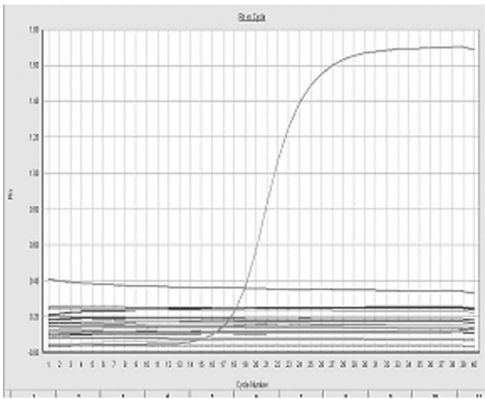


图 1 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因特异性实验结果图

2.2 灵敏度实验结果 见图 3、4 及表 2。曲线从左往右依次

为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、阴参的曲线图。

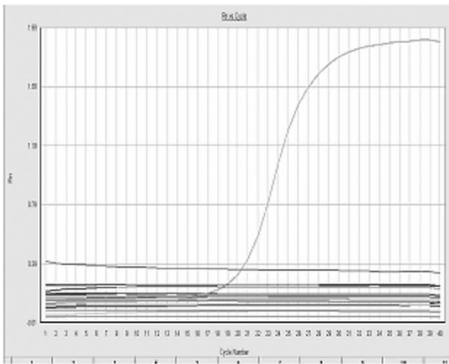


图 2 肠毒素 B 基因特异性实验结果图

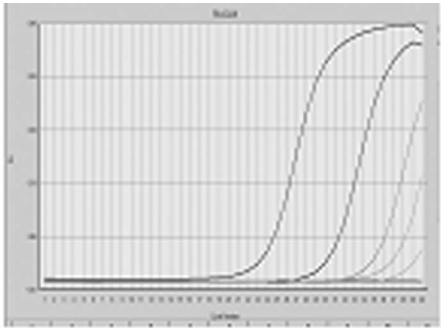


图 3 肠毒素 A 基因菌液灵敏度检测扩增曲线图

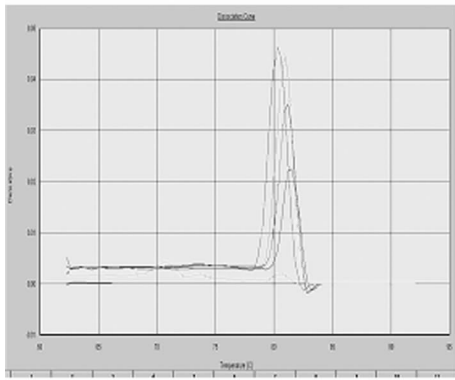


图 4 肠毒素 A 基因灵敏度检测熔解曲线图

表 2 5 种体系的菌液灵敏度和 DNA 灵敏度

体系名称	菌液灵敏度 (CFU/mL)	DNA 灵敏度 (ng/ μ L)
金黄色葡萄球菌肠毒素 A 体系	81	1.34
金黄色葡萄球菌肠毒素 B 体系	96	1.41
金黄色葡萄球菌肠毒素 C 体系	46	2.57
金黄色葡萄球菌肠毒素 D 体系	54	2.75
金黄色葡萄球菌肠毒素 E 体系	60	2.80

表 3 185 株金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布

肠毒素基因	阳性菌株(<i>n</i>)	携带率(%)
SEA	88	47.57
SEB	12	6.49

续表 3 185 株金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布

肠毒素基因	阳性菌株(<i>n</i>)	携带率(%)
SEC	15	8.11
SED	3	1.62
SEE	0	0.00
SEA+SEB	2	1.08
SEA+SEC	4	2.16
SEA+SED	3	1.62

2.3 金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布 上述体系优化成功后,对 185 株金黄色葡萄球菌野生株分别进行 A~E 5 种肠毒素基因检测。其中携带有任一种肠毒素基因的菌株 108 株,占全部菌株的 58.38%,详见表 3。

3 讨 论

现行的免疫学方法进行金黄色葡萄球菌的分型,不仅费时,而且比较困难。一是因为金黄色葡萄球菌毒素的特异性抗体难以制备,二是因为金黄色葡萄球菌毒素的表达在不同的条件下差异很大,毒素基因不表达或表达低时检测不到^[7]。PCR 的分型方法不仅快速、灵敏,而且不受毒素抗体制备和毒素基因表达的限制^[8-13]。

SYBR-Green 是一种能特异性与双链 DNA 结合的新型荧光染料,结合后能发出 560 nm 波长的荧光。PCR 反应完成后,当体系温度从 65 ℃逐渐升高,PCR 产物逐渐解链,检测的荧光值会逐步下降。当温度接近 *T_m* 值时,双链 DNA 解链速度急剧变化,熔解曲线会在该温度出现一个相应波峰。因此,不仅可以根据熔解曲线波峰的多少和狭窄程度,确定是否有非特异性 PCR 产物;还能根据波峰峰顶对应的温度是否与预期 *T_m* 一致,进一步确定产物的特异性和灵敏度。

由于荧光 PCR 灵敏度高于传统检验方法,并将检测时间由原来的至少 5 d 缩短至 1 d,因此在检测样品中金黄色葡萄球菌肠毒素时,可先用 SYBR-Green 荧光 PCR 进行快速筛选,以节省人力、物力,缩短检验时间。此法也可通过检测食品、患者呕吐物和排泄物等,快速诊断金黄色葡萄球菌食物中毒。

从金黄色葡萄球菌在本市食品污染物和食物中毒中的分布研究结果中发现,食品污染有 37.04%是由金黄色葡萄球菌引起。在食物中毒中有 75%是由金黄色葡萄球菌导致或者由金黄色葡萄球菌和其他引起食物中毒的病原均共同导致的。可见,建立的 SYBR-Green 荧光 PCR 可以用于食品污染物和食物中毒的快速诊断,可为疾病的预防和治疗提供良好的依据。

参考文献

[1] Thatcher FS. Microorganism in foods international association of Microbiological Societies(IAMS)[M]. Canada:University of Toronto Press,1975:1.

[2] Nikolay S,Dmitriy V. Simultaneous Analysis of Multiple Staphylococcal Enterotoxin Genes by an Oligonucleotide Microarray Assay[J]. Journal of Clinical Microbiology,2004,42(5):2134-2143.

[3] Martin M,Dinges PM. Schlievert Exotoxins of Staphylococcus aureus[J]. Clinical Microbiology Reviews,2000,13(1):16-34.

[4] 宋黎黎,杨兰萍,朱斌. PCR 技术在金黄色葡萄球(下转第 159 页)

性,精密度高。

本研究以 Randox 公司胱抑素 C 质控血清设定值为靶值,分析五个检测系统的偏倚。科华、景源、迈克、美康胱抑素 C 试剂检测结果与靶值的相对偏倚均在 CLIA'88 规定允许误差范围内,而利德曼试剂的低、中、高值的偏倚均大于允许偏倚。分析其原因,可能与试剂的测定原理(利德曼试剂为胶体金颗粒免疫比浊,另外四种试剂为免疫比浊)、标准赋值、参数设置等有关。实验结果提示,各个试剂组成的检测系统测定结果并不完全一致,与相关文献报道相似^[2],是否可通过校正因子来进行纠正,从而使检测结果在不同试剂组成的系统间达到一致存在争议,也有待进一步的验证研究。

本实验五个厂家的试剂盒组成的检测系统截距、非线性、漂移性均差异无统计学意义,说明各检测系统恒定误差小,检测结果具有良好的线性范围,试剂稳定性好。科华、景源、美康试剂盒的斜率无明显差异,说明试剂盒准确度高,不存在比例误差。而利德曼、迈克试剂盒的斜率有明显差异,但迈克试剂的偏倚在允许偏倚范围内,因此作者认为迈克试剂盒的准确度临床还是可以接受的。

携带污染率是表示各标本之间的交叉污染的指标,常用来检测仪器、试剂的互染率。对于一些检测范围较宽的项目,临床上可能出现极高值,较小的携带污染率也可对低值标本产生较大的影响^[12],说明仪器对加样系统和反应系统冲洗不是很干净。实验显示科华、景源、迈克、美康试剂均有携带污染,表明仪器的加样系统和反应系统冲洗不是很干净,因此还需加强仪器的维护、保养以及使用特殊清洗程序等措施降低交叉污染。

以上实验表明,利德曼试剂精密度和稳定性好、携带污染率低,在验证范围内有较好的线性关系,但测定 Randox 公司胱抑素 C 质控血清则偏倚较大。科华、景源、迈克、美康试剂盒的准确度和精密度较好,在验证范围内有较好的线性关系,稳定性好,分析性能符合厂家声明的要求和本室所确定的质量目标,该项目可用于临床标本的检测,但携带污染率的问题有待进一步改进。

参考文献

[1] Dhamidharka VR,Kwon C,Stevens G. Serum Cys C is superior to
(上接第 156 页)
菌肠毒素基因分型的应用[J]. 安徽预防医学杂志,2010,16(2): 150-151.
[5] 张严峻,张俊彦,梅玲玲,等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分型和分布[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(6):682-684.
[6] 吴平芳,石晓路,扈庆华,等. 深圳市细菌性食物中毒病原菌的调查与预防[J]. 职业与健康,2006,22(19):1563-1564.
[7] Gomei LE,Goyache J,Orden JA,et al. Production of enterotoxin in A by supposedly nonenterotoxigenic Staphylococcus aureus strains[J]. Appl Enriron Microbiol,1989,55:1447-1451.
[8] 张严峻,张俊彦,梅玲玲,等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因型分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(6):1417-1418.
[9] Omoe K,Ishikawa M,Shimoda Y,et al. Detection of seg seh, and seigenes in Staphylococcus aureus isolates and determination of

serum creatinine as a marker of kidney function;a meta-analysis [J]. Am J Kidney Dis,2002,40:221-226.
[2] 李海霞,王学晶,徐国宾,等. 两种不同检测系统测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的方法学评价[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(11):1284-1287.
[3] Lazerza OF,Price CP,Scott MG. Cystatin C:an improved estimator of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem,2002,48(5):63-69.
[4] 冯仁峰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2007:37.
[5] 徐国宾,蒋琳. 临床生物化学常规定量方法的分析性能评价[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(6):718-720.
[6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline[S]. EP10-A2,NCCLS,2002.
[7] 张秀明,温冬梅,袁勇. 临床生物化学检验质量管理与标准操作程序[M]. 北京:人民军医出版社,2007:103.
[8] Department of Health and Human Services, Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988:Final Rule[J]. Fed Register,2003,24(16):3640-3740.
[9] 孙宏华,石凌波,康红,等. 应用 NCCLS EP10-A2 文件分别对自建和配套生化检测系统进行初步性能评价[J]. 检验医学,2010,25(5):345-348.
[10] 庄健海,张劲丰,叶桂祥. 应用 EP10-A 对 Bayer 脱氧吡啶酚试剂盒的评价[J]. 江西医学检验,2005,23(5):101-102.
[11] Ehrmeyer SS,Laessing RH. Has compliance with CLIA requirements really improved quality in US clinical laboratories[J]. Clin Acta,2004,346(1):37-43.
[12] 张秀明,郑松柏,庄俊华,等. 临床化学发光免疫检测法检测 AFP 的分析性能验证方案与实验方法[J]. 中华检验医学杂志,2007(11):1293-1297.

(收稿日期:2011-08-08)

the enterotoxin productivities of S. aureus isolates Harboring seg she,or seigenes[J]. J Clin Microbiol,2002,40(3):857-862.
[10] Johnson WM,Tyler SD,Ewan EP,et al. Detection of genes for forenterotoxins,exfoliative toxins,and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol,1991,29:426-430.
[11] 张传宝,薛良辉. 山东省 1984~2002 年金黄色葡萄球菌引起食物中毒资料分析[J]. 预防医学文献信息,2003,9(5):486.
[12] 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.
[13] 邱阳,王刚,卢行安. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J]. 中国微生态学杂志,2004,16(2):23-26.

(收稿日期:2011-08-08)