

• 检验技术与方法 •

金黄色葡萄球菌溶解曲线分子分型体系的建立及应用^{*}

王 冰,李迎慧,扈庆华,林一曼,石晓路,邱亚群,贺连华,陈妙玲,吴平芳,许舒乐
(深圳市疾病预防控制中心,广东深圳 518055)

摘 要:目的 建立金黄色葡萄球菌溶解曲线分子分型体系,应用于金黄色葡萄球菌食物中毒快速溯源。方法 根据文献合成金黄色葡萄球菌 VNTR 位点的相应引物,用于检测已知 PFGE 型别的金黄色葡萄球菌,从中筛选出 4 个分辨力较高的位点。在此基础上建立溶解曲线分子分型体系,检测 59 株分离自食物中毒的金黄色葡萄球菌。结果 溶解曲线分子分型体系具有良好的精密度,其批内重复性实验的标准差(s)为 0.03~0.05 ℃,批间重复性实验的 s 为 0.04~0.06 ℃,日间重复性实验的 s 为 0.04~0.06 ℃。同时,溶解曲线分子分型体系能将 59 株金黄色葡萄球菌分为 19 个型别,包括 11 个流行克隆和 8 个散发克隆,Simpson 相关系数为 0.916 4。结论 建立的体系快速、灵敏度高、重复性好,能应用于金黄色葡萄球菌食物中毒的快速溯源和筛查。

关键词:金黄色葡萄球菌; 溶解曲线; 分子分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2354-03

Establishment and application of a molecular typing system of *Staphylococcus aureus* based on resolution melting^{*}

Wang Bing, Li Yinghui, Hu Qinghua, Lin Yiman, Shi Xiaolu, Qiu Yaquin,
He Lianhua, Chen Miaoling, Wu Pingfang, Xu Shule

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: **Objective** To establish a molecular typing system of *Staphylococcus aureus* by using resolution melting for food poisoning fast tracing. **Methods** Primers were designed and synthesized according to the literature of VNTR in *Staphylococcus aureus*, and were used to perform molecular typing on the strains which had detected by PFGE, then 4 types of VNTRs were with higher discriminatory power were selected. On this basis, we established a molecular typing system for the detection of 59 *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning. **Results** The molecular typing system has good precision for detection. The standard deviation(s) of within-batch repetitive experiments were 0.03—0.05 ℃, between-batch repetitive experiments were 0.04—0.06 ℃, between-day repetitive experiments were 0.04—0.06 ℃. At the same time, the 59 strains of *Staphylococcus aureus* were divided into 19 types which were 11 epidemic clones and 8 sporadic clones. The correlation coefficient of Simpson was 0.916 4. **Conclusion** The molecular typing system for *Staphylococcus aureus* based on resolution melting was simple, fast and repeatable. It can be applied to fast tracing and screen of *Staphylococcus aureus* in food poisoning.

Key words: *Staphylococcus aureus*; resolution melting; molecular typing

金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)在自然界中普遍存在,是造成人类食物中毒的常见致病菌之一^[1]。在欧盟,1993 年至 1998 年共发生了 926 起金葡菌食物中毒事件,占食源性疾病的 4.5%^[2]。近年来,我国由金葡菌引起的食物中毒事件在全国已占据第 4 位^[3]。深圳市食品污染物监测数据显示,平均有 5.0% 的食品存在金葡菌污染,而在散装熟食肉制品和豆制品中,这一比例则高达 30.0%^[4]。对疑似食物中毒的检测,其最重要的技术难点是实现从问题食品到患者的溯源,而分子分型是实现食物中毒准确溯源的主要技术依托。脉冲场凝胶电泳(PFGE)由于重复性好、分型率高、分辨能力强而被认为是金葡菌分型技术的金标准^[5-6]。由于 PFGE 操作繁琐,室间比对困难,近年来人们致力于研究基于 DNA 序列的分子分型方法。随着细菌基因组工作的蓬勃开展,人们发现数目可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)普遍存在于各类细菌中,且存在明显的多态性。目前,基于 VNTR 的分型技术的研究主要侧重于优化测序方法,分析序列间亲缘进化关系。本研究则利用溶解曲线能灵敏反应序列差异的特性,不需要测序就能快速分辨来自不同克隆群的金葡菌株,从而为

食物中毒快速溯源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 金葡菌 59 株,于 2006~2010 年分离自 12 例食物中毒患者,主要从剩余食品、患者肛拭子或粪便中分离。

1.2 仪器与试剂 SYBR Premix Ex Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司,营养肉汤、血平板及血浆凝固酶均购置北京陆桥技术有限责任公司。Light Cycler 2.0 实时荧光定量 PCR 系统为罗氏公司产品,电恒温培养箱(PYX-2805-A)购自广东韶关科力仪器公司,台式离心机(SIGMA1-13)购自德国贝克曼公司,超微量分光光度计(ND-1000)购自美国基因有限公司。

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,鉴定为金葡菌。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (1)模板提取参照试剂盒说明书进行;(2)反应体系:反应总体积为 20 μL,内含 SYBR Premix EXT2.0(2×) 10 μL;primer F 0.4 μL;primer R 0.4 μL;Rox(荧光染料)0.4 μL;DNA 模板 2 μL;dH₂O 7.2 μL。(3)反应条件:95 ℃、30 s、20 ℃/s;95 ℃、5 s、20 ℃/s,55 ℃、30 s(单通

^{*} 基金项目:广东省医学科研基金立项项目(B2012325);深圳市科技局立项项目(201102103)。 作者简介:王冰,女,副主任技师,硕士,主要从事病原微生物检测及生物信息学方面研究。

道检测)、20 ℃/s、72 ℃ 30 s,共 40 个循环;最后 60 ℃、15 s、0.05 ℃/s。

1.2.3 参比菌株的筛选 将 PFGE 分型方法作为金标准,选择已知 PFGE 分型结果的金葡萄菌作为参比菌株。每种型别中随机挑选一株作为代表株,共选出 12 株金葡萄菌代表 12 种不同带型。

1.2.4 分型位点的筛选 根据文献[7-8]针对不同的 VNTR 位点设计引物,检测 15 株已知 PFGE 带型的参比菌株,分析不同带型菌株在同一位点的熔解曲线变化情况,排除没有变化或变化不灵敏的位点,剩余位点组成分析体系做进一步分析。

1.2.5 精密度评价 (1)批内重复性实验:每批测试放置 31 管阳性样本和 1 管阴性对照,测试 3 批平行样,共分析 93 个数据的标准差。(2)批间重复性试验:将样本随机插入每批样中进行测试,记录样本每批实验的检测值,分析其标准差。(3)日间重复性试验:用固定的模板和引物体系进行每日检测,连续 20 d,每天一次。记录每天的检测值,分析其标准差。

1.2.6 熔解曲线分型效能分析 用筛选得到的 4 个分型位点(VNTR 61-01、VNTR 61-02、VNTR 61-023、VNTR 63-01)分别检测 59 株金葡萄菌野生株。每株菌检测 4 个 VNTR 位点,共获得 4 个 T_m 值。依次用 Bio Numerics 4.6 软件对 4 个位点分别进行分析,聚类图绘制采用非加权组平均数(UPGMA)方法。用 Simpon 公式计算不同位点组合的分辨系数(DI 值)。

2 结 果

2.1 分型位点筛选 VNTR 61-01 位点有 9 个有差异且稳定的 T_m 值,VNTR 61-02 为 6 个,VNTR 61-023 为 7 个,VNTR 63-01 为 8 个,其余位点分为 1~3 个。选择分型效果灵敏的 4 个位点组成分型体系,做进一步分析。

2.2 精密度评价 使用贝塞尔公式计算以下三种重复性实验的标准差(s)。(1)批内重复性实验中,VNTR 61-01 位点体系:n=93,s=0.04 ℃,极差 0.12 ℃;VNTR 61-02 位点体系:n=93,s=0.03 ℃,极差 0.15 ℃;VNTR 61-023 位点体系:n=93,s=0.04 ℃,极差 0.11 ℃;VNTR 63-01 位点体系:n=93,s=0.05 ℃,极差 0.14 ℃。(2)批间重复性试验中,VNTR 61-01 位点体系:n=12,s=0.06 ℃,极差 0.18 ℃;VNTR 61-02 位点体系:n=11,s=0.05℃,极差 0.15 ℃;VNTR 61-023 位点体系:n=13,s=0.04 ℃,极差 0.14 ℃;VNTR 63-01 位点体系:n=12,s=0.05 ℃,极差 0.14 ℃。(3)日间重复性试验中,VNTR 61-01 位点体系:n=20,s=0.04 ℃,极差 0.15 ℃;VNTR 61-02 位点体系:n=11,s=0.06 ℃,极差 0.13 ℃;VNTR 61-023 位点体系:n=13,s=0.06 ℃,极差 0.14 ℃;VNTR 63-01 位点体系:n=12,s=0.04 ℃,极差 0.15 ℃。

2.3 分型效果评价

2.3.1 聚类分析结果 对 59 株来自于 12 起食物中毒的金葡萄菌进行了熔解曲线检测,每株菌检测 4 个位点的 T_m 值,用 Bio Numerics 4.6 软件依次对不同位点组合进行分析,聚类分析采用非加权组平均数(UPGMA)。4 种位点组合依次将 59 株菌分为 9、13、15、19 个型别见表 1、附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。同时,这 59 株金葡萄菌被 PFGE 方法分为 15 个型别。

2.3.2 分辨力评价 根据聚类分析结果,进一步运用 Simpson 相关系数来评价不同位点组合的分辨率。随着位点的增加,位点组合的 DI 值依次提高,见表 1。组合 4 将 59 株菌分成 19 个克隆,包括 11 个流行克隆和 8 个散发克隆。克隆 1 有 8 株,克隆 2 有 4 株,克隆 3 有 5 株,克隆 4 有 3 株,克隆 5 有 7

株,克隆 6 有 2 株,克隆 7 有 3 株,克隆 8 有 12 株,克隆 9 有 2 株,克隆 10 有 3 株,克隆 11 有 2 株。

表 1 不同位点组合的聚类分析结果和分辨系数

组合 编号	VNTR 位点或组合	聚类分析 型别(n)	分辨系数 (DI 值)
1	61-01	9	0.849 8
2	61-01 和 61-02	13	0.865 0
3	61-01、61-02 和 61-023	15	0.887 2
4	61-01、61-02、61-023 和 63-01	19	0.916 4

3 讨 论

VNTR 又称小卫星 DNA,其普遍存在于各类细菌中。每个 VNTR 位点由中间的核心区和外围的侧翼区组成,核心区为串联重复序列首尾紧密相连。许多临床分离菌株的研究证实,同一 VNTR 位点在不同菌株间,其重复单元的拷贝数不同,即存在明显的多态性,但其侧翼序列具有高度保守性^[9]。根据被检菌株某位点的碱基数量,减去上下游侧翼区碱基数量,可推算出该位点的重复单元的拷贝数,所有位点的重复单元数可成为该菌株的数字编码如 3-1-2-1,具有高度特异性。

目前,国内外关于 VNTR 扩增产物的分析,主要是测序和电泳两种方法。电泳方法主要是将扩增产物的电泳位置与 DNA 标准带(Marker)进行对比,利用软件估算出产物的片段大小。这种方法误差为±10 bp,不能用于短重复序列 VNTR 位点的研究,且步骤较繁琐。测序方法主要是检测产物序列,去掉两端侧翼区序列后得到高变区序列,然后通过计算得到重复单元数。这种方法需要专用仪器且费用较高,不利于在基层推广。

高分辨率熔解曲线(HRM)分析是一门新兴的技术。它通过在 PCR 体系中加入饱和染料,在 PCR 结束之后直接运行高分辨率熔解,通过比对 DNA 双链解链的 T_m 值和图形,就可以发现相互间的微小序列差异,完成对样品基因型的分析。这种检测方法不受碱基位点与类型的局限,不需要序列特异性探针,实现了闭管操作,从而应用在突变扫描、序列配对和基因分型等多个方面。

前述电泳和测序方法,其目的都是为了了解 VNTR 位点的片段大小,最终得到重复单元数。但是,本课题应用的熔解曲线方法则另辟蹊径。这个方法不能得到片段大小,但是它能精确比对同一 VNTR 位点在不同菌株之间的差异。当 A 株与 B 株的同一 VNTR 位点相差 1 个重复单元或以上时,两者熔解曲线的 T_m 值和图形都会有差异,T_m 值差异的大小与 DNA 序列差异的多少有一定关系。当对多个 VNTR 位点同时进行分析,其系列 T_m 值和熔解曲线可形成数字化结果及图谱,同一克隆群的菌株有着相近的 HRM 结果,而亲代关系较远的菌株,其 HRM 结果差异较大。将一株菌数个 VNTR 位点的 T_m 值作为一组数列,用软件进行聚类分析,可以获得菌株之间的亲缘近代关系。

本次研究获得了良好的精密度,批内、批间和日间重复性实验的标准差为 0.03~0.06 ℃,极差为 0.11~0.18 ℃,能否较好的区分不同菌株间序列差异。

以 PFGE 为金标准评价本研究的分型能力。PFGE 能够将 59 株菌分为 12 个型别,DI 值为 0.855 0。而 4 个位点的熔解曲线分型体系能将 59 株菌分为 19 个型(下转第 2358 页)

HPV16 感染宫颈脱落细胞或其他人类细胞样本中病毒整合所致 E2 基因破坏的发生有效可行。本方法仅限于检出 E2 基因破坏的病毒整合,5 例病变组样本未能分析到 E2/E6 基因拷贝数比值的下降,并不能排除病毒整合。整合而导致的基因破坏发生在其他位置的可能,需进一步设计新的方法加以分析。由于国内外 HPV 病毒整合位点的研究数据尚不够充分,目前适用于临床检出各种位点发生的 HPV 病毒整合的方法还有待研究。此外本研究所检测的样本量不大,未检测到 $I_{HPV} = 0.0$ 即完全整合型的样本,要阐明致癌分子机制尚需更多的相关样本检测数据作支持。

参考文献

[1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical Cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.

[2] Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(5): 513-517.

[3] Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, et al. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3828-3832.

[4] Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical Cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 886-891.

[5] Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. Characterization of natural-

ly occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions[J]. Cancer Res, 2008, 68(20): 8249-8259.

[6] Annunziata C, Buonaguro L, Buonaguro FM, et al. Characterization of the human papillomavirus (HPV) integration sites into genital cancers[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(4): 803-808.

[7] Ho CM, Chien TY, Huang SH, et al. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical Cancer, and high viral loads predict risk of cervical Cancer[J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(1): 54-60.

[8] Cheung JL, Cheung TH, Tang JW, et al. Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive Cancer[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1356-1362.

[9] Das P, Thomas A, Mahantshetty U, et al. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41012.

[10] 张帅, 蔡红兵, 丁晓华. 应用 E2 基因缺失的检测评价宫颈病变中 HPV16 感染状态[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2011, 32(2): 207-210.

[11] Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 521-526.

[12] 余南, 辜为为, 刘红娥, 等. 广州地区人乳头瘤病毒主要基因型及其种系发生分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(11): 816-819.

(收稿日期: 2014-03-08)

(上接第 2355 页)

别, DI 值为 0.916 4, 熔解曲线分型体系的分型能力高于 PF-GE。从表 1 可以看出, 单独使用位点 VNTR 61-01 已能获得较好的分型能力, 而随着位点的逐渐增加, 分型能力缓慢上升。这主要是因为 VNTR 61-01 的重复单位为 60 bp 且具有多变性, 比其他位点的分型能力强。所以, 选择位点进行组合时, 既要考虑分型能力, 也要考虑操作成本, 当位点增加到一定程度对提高分型能力作用不大时, 则不再增加分析位点。

本研究能够将来自统一克隆的菌株分为同一型别, 即能够较准确的将来自不同食物中毒的菌株分为同一克隆, 与流行病学资料较为吻合。同时该方法操作简便、分析便捷、成本较低, 具有很好地在基层推广应用前景。

参考文献

[1] Sergeev N, Volokhov D, Chizhikov V, et al. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2134-2143.

[2] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Schlievert exotoxins of staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 16-34.

[3] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.

[4] 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.

[5] Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of

pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1574-1585.

[6] Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2186-2190.

[7] Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1801-1804.

[8] Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of Staphylococcus aureus isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3095-3100.

[9] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data[J]. J Bacteriol, 2004, 186(5): 1518-1530.

(收稿日期: 2014-05-18)