Rapid Detection of Staphylococcus Aureus Food Poisoning by Multiplex PCR and Analysis of Enterotoxin Resistance

Lei Liu

Mudan District Center for Disease Control and Prevention, Heze, Shandong, 274000, China

Abstract

Objective: To explore the rapid detection of Staphylococcus aureus food poisoning by multiplex PCR and enterotoxin resistance. **Methods:** 7 samples of environmental smears were collected and DNA was extracted. 14 kinds of food borne pathogenic bacteria were detected by multiplex PCR and staphylococcal enterotoxin ELISA was detected. Staphylococcus aureus was isolated and identified according to food safety regulations. The drug resistance and enterotoxin genotyping (sea-see) were analyzed. **Results:** Multiplex PCR and ELISA were positive for S. aureus and enterotoxin in both the counter top smear and the case samples. Three strains and ten strains of S. aureus were isolated with enterotoxin genes, and both the counter top smear and the case samples had toxin gene isolates. All isolates were resistant to ampicillin and penicillin. **Conclusion:** This food was caused by enterotoxin of Aureus aureus, which is resistant to drugs, and the corresponding department needs to monitor and supervise the hygiene of small restaurants.

Keywords

staphylococcus aureus; enterotoxin gene; drug resistance

金黄色葡萄球菌食物中毒的多重 PCR 快速检测及产肠毒素耐药分析

刘磊

牡丹区疾病预防控制中心，中国 · 山东 菏泽 274000

摘　要

目的：探究金黄色葡萄球菌食物中毒的多重 PCR 快速检测及产肠毒素耐药。**方法：**收集环境涂抹物 7 份，提取总样本 DNA 对 14 种食源性致病菌多重 PCR 检测，检测样品葡萄球菌肠毒素 ELISA。并按照食品安全规定分离鉴定金黄色葡萄球菌，分离的菌株分析其耐药与肠毒素基因分型（SEA-SEE）。**结果：**多重 PCR 与 ELISA 检测台面涂抹物和病例中样本金黄色葡萄球菌与肠毒素均是阳性。经分离得出金黄色葡萄球菌 3 株、10 株，分别带有肠毒素基因，台面涂抹物与病例样本均带有毒素基因分离株，并带有相同肠毒素基因的菌株耐药效果一致。全部分离株对氨苄西林与青霉素均耐药。**结论：**此食物是由金黄色球菌肠毒素引发，有耐药现象，对应部门需对小型饭馆卫生进行监督管理。

关键词

金黄色葡萄球菌；肠毒素基因；耐药

1 引言

金黄色葡萄球菌时一种革兰阳性球菌，隶属微球菌科葡萄球菌属，于自然环境中应用较广，携带人员达 20% 以上。美国疾控中心有报告，金黄色葡萄球菌感染人群数量位居第二，容易使全部人群感染。中国出现的细菌性食物中毒事件 20% 以上是金黄色葡萄球菌诱发，此菌对营养不会有过高的要求，耐受不良环境，还可分泌较多类型的肠毒素 [1]。金黄色葡萄球菌肠毒素具备较高的热稳定性，是碱性蛋白质，步入消化系统后能抵抗多数胃蛋白水解保留活性容易诱发食物中毒，其症状会表现为腹泻、呕吐，摄入 1h 以上会出现中毒，症状病程较短，一般在 1~3d，能自愈，不会出现较多死亡。经调查发现，有小饭馆鸡肉盖浇饭与食物中毒比较类似，患者食用后 2~3h 内就会出现严重的腹泻与呕吐，与食物中毒比较类似的剩余食物是质疑对象 [2]。为了解交叉感染所存在的安全隐患，本研究同时对现场流行病进行采样和实验室验证，以证实此食物中毒事件是金黄色葡萄球菌肠毒素污染所致。

2 资料与方法

2.1 临床资料

搜集对应样本 12 份，其中食品包括 1 份当天剩下米饭、新鲜鸡胸肉 2 份、酱汁 1 份、环境涂抹样本 7 份、塑料饭盒涂抹物和操作台面 1 份；疾病样本：呕吐物 1 份，检测到金黄色葡萄球菌、沙门菌等各种食源性致病菌。

2.2 仪器和试剂

2.2.1 仪器

高智能全自动微生物分析系统（VITEK 2 Compact），德国生产的荧光定量 PCR 仪，均是全自动毛细管电泳系统；中国生产的 S160 急速核酸提取仪；药敏检测仪；浊度仪；生化鉴定卡；平板；显色平板；血平板。

2.2.2 试剂

营养肉汤、血浆凝固酶干粉、革兰染液；3M 葡萄球菌肠毒素迅速检测试剂盒；金黄色葡萄球菌肠毒素 A-E 型荧光 PCR 检测试剂盒；多种食源性致病菌多重 PCR 测定试剂盒；DNA 食品细菌提取试剂盒。

2.3 方法

2.3.1 致病菌多重 PCR 检测与分离鉴定

（1）检测样品总 DNA 提取和多重 PCR

取涂抹物 10g 食品添加生理盐水 10ml，均质后取液体部分，运用 S160 急速核酸提取仪、配备的试剂盒，提出的总样本总 DNA 展开多重 PCR。PCR 反应体系是 2× 核酸反应液 12.5 μ l，PCR 酶 1 μ l×25，引物反应液 2.5 μ l×10，生理盐水 7 μ l，DNA 模板 2 μ l，总反应体系 25 μ l。

反应条件：预变性 95℃ 4min，循环 30 个，30s95℃，30s62℃，30s1min72℃。延伸 5min72℃，保存备用 4℃，毛细管电泳检测 PCR 产物。

（2）鉴定致病菌分离

于显色平板上划上均质后的液体划线，包括各式平板。于营养肉汤中接种采集的样品，呕吐样品不增菌直接计数并划线分离。平板上分离的纯菌落实施血浆凝固每试验与革兰染色镜检，选择阳性菌株于 VITEK 鉴定。余下显色平板上与菌株依据国家微生物检验标准操作流程实施。

2.3.2 迅速检测食品中肠毒素

在缓冲液 20ml 中加入样品 10g/ml，离心后 10min，将上清液过滤，取 1ml 添加 50 μ l 与其充分混合。吸取 200 μ l 混合液到孔板 96 中，添加阳性与阴性对照，运用 3M 葡萄球菌肠毒素迅速对试剂盒进行检测，做好孵育和洗涤，检测肠毒素，按照实际颜色判断吸光度读数结果。

2.3.3 肠毒素基因分型荧光 PCR 检测

将分离的金黄色葡萄球菌于血平板上划线，选择 3~5 个单菌放置于无菌水中，离心弃沉淀，添加溶菌酶 200 μ l 缓冲液在 37℃下水浴，煮沸后 10min，离心 13000g 4℃，收集上清液作 DNA 模板。分别实施金黄色葡萄球菌肠毒素不同型荧光 PCR 反应。总反应体系 25 μ l，包含 PCR 反应液 19.5 μ l、混合酶液 0.5 μ l，模板 DNA5 μ l。

荧光 PCR 反应条件：UNG 处理 2min 的 0.5 μ l，预变性 95℃ 5s3min，PCR 条件 95℃ 5s 与 55℃ 60s，循环 40 个，收集 FAM 荧光信号 55℃。并添加阳性，阴性与空白比对。

2.3.4 药敏实验方法

运用临床和实验室标准化协会推荐的药敏试验抗生素选择准则把握抗生素种类，运用微量肉汤稀释法做药敏实验，定量对致病菌较低的抑菌浓度进行测定，药敏质控标准柱是金黄色葡萄球菌。

3 结果

3.1 分析抗菌药物信息和数据

表 1 抗菌药物信息和数据分析

抗生素	MIC检测值(μ g/ml）	MIC 解释标准（ μ g/ml）			药敏结果（%）		
		敏感	中介	耐受	敏感	中介	耐药
氨苄西林	0.49-15.99	≤ 8	15	≥ 31	0.00	0.00	100.00
苯唑西林 + 2% Na Cl	0.49-3.99	≤ 2	-	≥ 3	30.76	0.00	69.22
头孢西丁	3.99-7.99	≤ 8	15	≥ 31	30.76	0.00	69.22
万古霉素	0.49-1.01	≤ 2	4-7	≥ 31	100.00	0.00	0.00
克林霉素	0.11-7.99	≤ 0.5	1-1	≥ 3	76.91	0.00	23.07
四环素	0.49-1.01	≤ 4	7	≥ 15	100.00	0.00	0.00
达托霉素	0.24-0.49	≤ 1	-	-	100.00	0.00	0.00
红霉素	0.49-7.99	≤ 0.5	1-3	≥ 7	76.91	0.00	23.07
氯霉素	0.79-15.99	≤ 8	15	≥ 31	76.91	23.07	0.00
环丙沙星	0.11-0.24	≤ 1	1	≥ 4	100.00	0.00	0.00

甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑	0.11/2.37−0.49−9.49	≤ 2/37	−	≥ 4/75	100.00	0.00	0.00
庆大霉素	1.01−4.01	≤ 4	7	≥ 15	100.00	0.00	0.00
青霉素	0.24−7.99	≤ 0.11	−	≥ 0.24	0.00	0.00	100.00

所有金黄色葡萄球菌中，携带同种肠毒素基因的菌株耐药数据一致。含有菌株对青霉素类药物氨苄西林药物谱。几株含有 seb 菌株对青霉素药物为氨苄西林、苯唑西林、青霉素等。对苯病醇类药物氯霉素中介。不含有肠毒素基因的菌株仅对青霉素药物产生作用，耐药谱：Pen−Amp，分离出来的株对氨苄西林具有耐药性，见表 1。

3.2 分析金黄色葡萄球菌分离鉴定数据

依据多重 PCR 数据，选取 12 份样本实施球菌分离，检测肠毒素，增菌后 6 号样本操作台面涂抹与未增菌的 8 号样本呕吐物均检出与金黄色葡萄球菌比较类似的物质，经革兰染色镜检，血浆凝固酶与上级鉴定均是阳性。与多重 PCR 检测数据相同，不同分离的阳性菌株是 10 和 3 株，编号：17S601−17S603 与 17S801−17S810。从 8 号样本呕吐物中所分离的金黄色葡萄球菌为 10 株，于血平板上菌落形态差异较大，少数菌株颜色偏灰白，表面比较湿润，少数菌株呈灰白色，表面比较干燥，其余的菌株是黄色表面湿润，镜检形态差异较小，是革兰阳性，圆形以葡萄状展现。

3.3 肠毒素鉴定与基因分型

运用荧光 PCR 和 ELISA 对食品中肠毒素与分离的肠毒素基因型，肠毒素检测数据经 Color Card 判断，仅有 6 号和 8 号显示为阳性。肠毒素基因型荧光 PCR 数据得出：呕吐物样本中的 10 株分离菌中，编号 17S808、17S809/17S810 检查出肠毒素基因，编号从 17S808−810. 其余 4 株没有检查出肠毒素基因，3 株操作台涂抹物分离株，全部检查出肠毒素基因。

3.4 多重 PCR 鉴定数据

毛细管电泳数据得出：仅有 6 号码台面涂抹物与 8 号呕吐样本中金黄色葡萄球菌阳性，B 管中 7 种病菌均呈阴性。

4 讨论

研究从食物中直接提取的细菌总 DNA 实施不同食源性致病菌较多 PCR，毛细管迅速对 PCR 产物进行检测，将传统的培养时间迅速缩短，迅速对食物中毒事件加以应对。有实践得出：运用较多 PCR 和传统分离方式对样品弯曲菌进行检测，检出率占据 73.8%、26.0%，后发现 PCR 方式检出率远比传统分离之法高，但后续所实施的耐药和溯源剖析需得到分离株，所以以往的鉴定方式需优化 [3−4]。

金黄色葡萄球菌诱发的食物中毒标准阈值是 10^5cfu(ml)，所以，全部样本中除过呕吐样本直接提取总 DNA，剩下涂抹物和食品样本是肉汤增菌后提取的总 DNA。接着按照涂抹物与食品样均是肉汤增菌后提取总 DNA[5]。并按照中国食品安全准则所要求的流程分离纯化金黄色葡萄球菌，分离数据和多重检测数据一致，仅有操作平面涂抹物和呕吐物分离的金黄色葡萄球菌。借助肠毒素迅速诊断试剂盒可同时对样本中存在的常见肠毒素进行检测，是菌株分离和肠毒素基因分型依据 [6−7]。分离得到的金黄色葡萄球菌，操作台面涂抹物与呕吐物中所分离的均是检查出的肠毒素基因，和耐药数据是一致性。呕吐样本中还存在携带基因的菌株，耐药谱中抗生素种类繁多，少数菌株不带有肠毒素基因，全部分离的株对氨苄西林与青霉素具有较强的抗击作用 [8]。

上述实验可得出，可能诱发食物中毒的肠毒素不是只有一种，呕吐物样本分离株存在较多的基因，代表食物中毒是携带较多基因的金黄色葡萄球菌，呕吐物分离的肠毒素基因型球菌存在程度不同的耐药，其原因可能可患者服用的抗生素相关。操作台面涂抹物分离株含有基因，代表饭馆实际操作加工环节存在金黄色葡萄球菌交叉污染问题 [9−10]。

当前研究较多的金黄色葡萄球菌肠毒素多数具有超抗原和催吐活性，疾病机理是肠毒素超抗原经抗原递呈作用和主要的相容性复合体分子结合，有效激活 T 细胞释放细胞因子，对胃肠黏膜神经受体起到良好的刺激作用，对大脑呕吐中心产生作用。引起 SEA 与 SEB 最常见的容易导致食物中毒，调查得出市面金黄色葡萄球菌检出率达 24.2%，携带肠毒素基因最多，达 96.1%[11−12]。主要是带有 5 种以上的毒素基因，多种移动基因元件在互相作用下会出现转移甚至重组，还可于金黄色葡萄球菌株之间传播，出现全新的肠毒素基因，诱发遗传变异与进化。抗生素在肉类养殖业中的广泛应用，菌株耐药现场极为常见，尤其是耐甲氧西林是金黄色葡萄球菌，具有较强的抗生素耐受性，若食品遭受污染会使治疗难度极度增加 [13−14]。金黄色葡萄球菌所诱发的肠毒素需高度重视，尤其是中小型饭馆食品的安全，严格把控操作环境的卫生状

况，定期对厨具或操作台面进行消毒，避免生熟交叉污染，将食物中毒降为最低。

综上所述，分析金黄色葡萄球菌食物中毒的多重 PCR 快速检测及产肠毒素耐药，食物中毒的诱发根源是金黄色球菌肠毒素，耐药性较强，相关部门需对小饭馆加强监督和检查。

参考文献

[1] 栾阳 , 张晔 , 张金 , 等 . 一起由金黄色葡萄球菌及其肠毒素引发食物中毒的实验室检测与分析 [J]. 医学动物防制 ,2018(11):67−70.

[2] 孙冰清 , 姜芹 , 张文刚 , 等 . 基于 qPCR 检测金黄色葡萄球菌 3 种肠毒素基因的方法研究 [J]. 食品安全质量检测学报 ,2020(09):2798−2805.

[3] 闵文光 , 余慧宏 , 魏建萍 , 等 .3 种食源性致病菌的多重 PCR 快速检测方法研究 [J]. 实验与检验医学 ,2018(04):499−501.

[4] 杨庆文 , 国译丹 , 汤晓召 , 等 . 云南省食品中金黄色葡萄球菌耐药性和 mecA 基因的检测及分析 [J]. 中国食品卫生杂志 ,2018(05):18−23.

[5] 章海通 , 邢家溧 , 傅晓 , 等 . 食源性金黄色葡萄球菌产肠毒素情况及耐药性分析 [J]. 食品研究与开发 ,2019(20):175−179.

[6] 吴南卫 , 朱兰兰 , 尹江源 , 等 . 一起由产 A 型肠道毒素金黄色葡萄球菌引起的食物中毒实验室分析 [J]. 海南医学 ,2019(08):101−103.

[7] 刘晶 , 李珊珊 , 李树玲 , 等 . 胶体金免疫层析法快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 和 B[J]. 中国热带医学 ,2017(02):185−185.

[8] 国译丹 , 杨祖顺 , 邹颜秋硕 , 等 .2010−2016 年云南省食品金黄色葡萄球菌污染监测分析 [J]. 食品安全质量检测学报 ,2017(10):3790−3794.

[9] 吕国平 , 李亚子 , 郭玉梅 , 等 . 金黄色葡萄球菌食物中毒株遗传特征分析 [J]. 中国病原生物学杂志 ,2018(02):185−188.

[10] 陈创 . 金黄色葡萄球菌食物中毒的病原调查分析 [J]. 中国保健营养 ,2019(32):356−357.

[11] 林奇峰 , 林学尧 . 一起伴诺如病毒感染的金黄色葡萄球菌食物中毒事件调查 [J]. 上海预防医学 ,2018(06):480−483.

[12] 董蕾 , 刘慧敏 , 孟璐 , 等 . 快速检测金黄色葡萄球菌活菌的研究进展 [J]. 食品工业 ,2017(10):253−259.

[13] 左乐 , 姜尹祥 , 石晓路 , 等 . 高通量荧光 PCR 组合方法鉴定 16 种金黄色葡萄球菌肠毒素的方法建立及评估 [J]. 疾病监测 ,2018(09):753−757.

[14] 陈慧中 .1 起金黄色葡萄球菌引起的食源性疾病暴发调查 [J]. 预防医学论坛 ,2018(11):871−873.