

2009—2020 年北京市朝阳区 113 株食源性金黄色葡萄球菌耐甲氧西林和肠毒素/类肠毒素基因携带与分子分型分析

王 琦^{1,2}, 郝 民², 王恒伟², 邵希凤², 宋衍燕^{2*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院, 包头 014040; 2. 北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 100020)

摘 要: **目的** 了解北京市朝阳区 2009—2020 年 113 株食源性金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药、肠毒素/类肠毒素基因携带和分子分型情况。**方法** 采用纸片扩散法进行头孢西丁药物敏感性实验, 结合 *mecA* 基因扩增鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA); 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, QR-PCR)检测 28 种金黄色葡萄球菌肠毒素/类肠毒素(staphylococcal enterotoxins/enterotoxin-likes, SEs/SEIs)基因; 采用脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)进行分子分型。**结果** 检出 7 株 MRSA (6.19%、7/113); 所有菌株至少携带 1 种肠毒素/类肠毒素基因, 最多携带 14 种, 共检出 24 种肠毒素/类肠毒素基因; 经典 *sea-see* 肠毒素基因携带率为 0%~33.63%。MLST 共 24 型, ST1、ST398、ST7、ST59 为优势型; 发现 ST6656、ST6688、ST6709、ST6745、ST6754 5 个新型别。PFGE 共分 25 型, H 型(11/113)、I 型(9/113)、J 型(29/113)是优势分型, 占比 43.36%。**结论** 本地区食源性金黄色葡萄球菌 MRSA 菌株分离率低于临床株; PFGE 分型结果中 J、H、I 3 种优势型占比近半, 显示本地区食源性金黄色葡萄球菌优势菌株集中; 优势 ST 型别主要与医院、社区感染和动物相关。新发现 5 个 ST 型别; 肠毒素/类肠毒素携带与 ST 型别存在一定关联性; ST1-MSSA-*sea-seh-sek-seq-selw-selx* 是优势株; 仅检测 5 种经典肠毒素不能代表金黄色葡萄球菌引起食物中毒的致病因子, 应扩大肠毒素检测范围。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 类肠毒素; 脉冲场凝胶电泳; 多位点序列分型

Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and enterotoxins/enterotoxin-likes and molecular typing of 113 strains *Staphylococcus aureus* from foodborne in Chaoyang district of Beijing from 2009 to 2020

WANG Qi^{1,2}, HAO Min², WANG Heng-Wei², SHAO Xi-Feng², SONG Yan-Yan^{2*}

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China;
2. Center for Disease Control and Prevention of Chaoyang District, Beijing 100020, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the methicillin-resistance, enterotoxin/enterotoxin-like gene carrier and

基金项目: 北京市朝阳区科技计划项目(CYSF2011)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Chaoyang District, Beijing (CYSF2011)

*通信作者: 宋衍燕, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与环境卫生。E-mail: songyanyancdc@163.com

*Corresponding author: SONG Yan-Yan, Ph.D., Chief Inspector, Beijing Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, No.23, Huaweili, Chaoyang, Beijing 100020, China. E-mail: songyanyan@163.com

molecular typing of 113 foodborne *Staphylococcus aureus* strains from 2009 to 2020 in Chaoyang district, Beijing.

Methods Detection of cefoxitin drug susceptibility test by disc diffusion method combined with amplification of *mecA* gene to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of 113 strains of *Staphylococcus aureus*; 28 kinds of staphylococcal enterotoxins/enterotoxin-likes (SEs/SEls) genes were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (QR-PCR). Molecular typing was performed by pulsing field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. **Results** Seven strains of MRSA (6.19%, 7/113) were detected, all strains carried 1–14 kinds of SEs/SEls genes, and a total of 24 kinds of SEs/SEls genes were detected, the carrying rate of *sea-see* enterotoxin genes was 0%–33.63%. MLST could be divided into 24 types, ST1, ST398, ST7, ST59 were the dominant type, 5 new types of ST6656, ST6688, ST6709, ST6745 and ST6754. PFGE could be divided into 25 types, H type (11/113), I type (9/113) and J type (29/113) were the dominant types, accounting for 43.36%. **Conclusion** The isolation rate of foodborne *Staphylococcus aureus* MRSA strain is lower than that of clinical strains, the 3 dominant types of J, H, and I account for nearly half of the PFGE typing results, indicating that the dominant strains of foodborne *Staphylococcus aureus* are concentrated in the region. The main ST types are associated with nosocomial, community infection and animal, and 5 new ST types have been found. There is a certain correlation between enterotoxins/enterotoxin-likes and ST type, ST1-MSSA-*sea-seh-sek-seq-selw-selx* is the dominant strain; only 5 kinds of classical enterotoxins can not represent the pathogenic factors of food poisoning caused by *Staphylococcus aureus*, so the detection scope of enterotoxins should be expanded.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; staphylococcal enterotoxins; enterotoxin-likes; pulsed field gel electrophoresis; multilocus sequence typing

0 引 言

金黄色葡萄球菌是除沙门氏菌及副溶血弧菌外的第 3 大类常见食源性致病菌^[1]; 肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)是金黄色葡萄球菌导致食物中毒的主要外毒素之一, 其通过刺激腹部脏器中的迷走神经引起急性喷射性呕吐等症状^[2], 至今已发现 *sea-selz*、*sel26*、*sel27* 等 28 种肠毒素/类肠毒素基因。*sea-see* 是最先发现的经典肠毒素基因^[3], 其他肠毒素/类肠毒素也陆续在食源性金黄色葡萄球菌(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)中被检出^[4-5], 但缺乏系统性检测和分析食源性金黄色葡萄球菌中 28 种肠毒素/类肠毒素基因携带情况的相关研究。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是 2017 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公布的 12 种致命耐药菌之一^[6], 其耐药谱广、感染治疗困难; 相比于临床分离株的报道, MRSA 在食品分离株中的数据相对匮乏。食源性致病菌常需进行溯源分析, 脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是常用的细菌同源性和遗传进化分析的分子分型技术。

PFGE 通过对细菌全基因组进行酶切, 经电泳分型, 有较高的特异性, 在金黄色葡萄球菌公共卫生事件的溯源分析中应用广泛^[7]; MLST 通过对金黄色葡萄球菌多个保守基因部分片段测序进行分型, 目前数据库中已包含 7000

余种 ST 分型, 依托公共数据库实现全球数据共享, 便于金黄色葡萄球菌遗传进化规律的研究^[8], 两种方法相结合可以了解菌株间的同源性和分子流行特征。

本研究对 2009—2020 年北京市朝阳区 113 株食源性金黄色葡萄球菌进行耐甲氧西林、28 种肠毒素/类肠毒素基因携带情况和 MLST、PFGE 分子分型分析, 全面了解食源性金黄色葡萄球菌分子学特征, 为病原溯源分析提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

113 株金黄色葡萄球菌均来自 2009—2020 年北京市朝阳区食品安全事故与国家食品微生物及其致病因子监测项目中的各类食品, 依据 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》进行生化鉴定。

质控菌株: 金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC43300, 美国典型微生物菌种保藏管理中心)。

1.2 仪器与试剂

iCycler PCR 扩增仪、Bio-Rad CHEF MAPPERTM 脉冲场凝胶电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); Quant Studio 5 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司); QIAxcel 毛细管电泳仪(德国 QIAGEN 公司); MiniSpin 小型微量离心机(德国 Eppendorf 公司); Touch Duo 超微量核酸测定仪(英国

BioDrop 公司)。

28 种肠毒素/类肠毒素实时荧光定量 PCR 试剂盒(北京中瑞恒达公司); Taq PCR Master Mix Kit(德国 QIAGEN 公司); 哥伦比亚血琼脂平板(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Sma I 限制性内切酶(20000 U/mL, 美国 Biolabs 公司); Xba I 限制性内切酶(15 U/ μ L, 日本 TaKaRa 公司); Sea Kem Gold Agarose 琼脂糖凝胶(瑞士 Lonza 公司); 10000 $\times$ Gel Red 染液(美国 Biotium 公司); MHA (mueller-hinton agar)培养基(北京陆桥公司); 头孢西丁药敏实验纸片(30 μ g, 英国 Oxoid 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 *mecA* 耐药基因扩增

采用普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法扩增金黄色葡萄球菌 β -内酰胺类耐药基因 *mecA*, 参考文献合成引物^[9] (表 1); PCR 扩增体系: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, 模板 2 μ L; PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.3.2 肠毒素/类肠毒素基因检测

金黄色葡萄球菌 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*tsst-1*、*seg*、*seh*、*sei*、*sej*、*sek*、*sel*、*sem*、*sen*、*seo*、*sep*、*seq*、*ser*、*ses*、*set*、*selu*、*selv*、*selw*、*selx*、*sey*、*selz*、*sel27*、*sel28* 检测参考试剂盒葡萄球菌 28 种肠毒素/类肠毒素(实时 PCR Taqman 探针法)说明书进行。

1.3.3 头孢西丁药物敏感性实验

采用纸片扩散(K-B)法进行头孢西丁药物敏感性实验: 将均匀涂布菌液和药敏纸片的 MHA 平板置于(36 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 培养 16~18 h, 使用游标卡尺测量抑菌环直径。依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)颁布的执行标准, $\leq$ 21 mm 判定为耐药, 抑菌环 $\geq$ 22 mm 为敏感。ATCC25923、ATCC43300 为质控菌株。

1.3.4 MLST 分型

扩增金黄色葡萄球菌的 7 个管家基因^[8] (表 1), 扩增产物经双向测序, 测序结果上传至 MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/>), 获得 MLST 分型结果。PCR 扩增体系: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L、ddH₂O 19 μ L, 模板 2 μ L; PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.3.5 PFGE 测定

参考郝民等^[10]报道中金黄色葡萄球菌 PFGE 分子分型操作方案, 对 113 株金黄色葡萄球菌进行 PFGE 分型。Marker 沙门氏菌 H9812 使用 *Xba* I 限制性内切酶。电泳条件: 起始脉冲时间: 4.0 s; 终止脉冲时间: 40.0 s; 电压: 6 V; 脉冲夹角(included angle): 120 $^{\circ}$; 电泳时间: 19 h, 电泳温度: 14 $^{\circ}$ C。经 GelRed 染色成像, 使用 BioNumerics 软件以 90% 相似度进行聚类型。

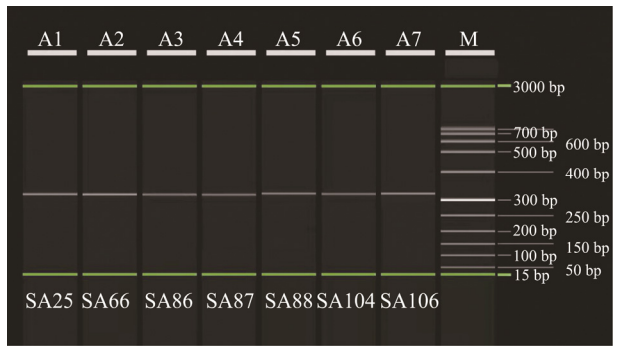
2 结果与分析

2.1 MRSA 菌株鉴定结果

113 株食源性金黄色葡萄球菌头孢西丁药物敏感性实验结果显示: 7 株抑菌环直径 $\leq$ 21 mm, 106 株抑菌环直径 $\geq$ 22 mm。113 株食源性金黄色葡萄球菌 *mecA* 耐药基因 PCR 扩增结果见图 1, 7 株 *mecA* 基因阳性, 106 株 *mecA* 基因阴性, 结果与 *mecA* 基因扩增结果一致。综上可得, 113 株食源性金黄色葡萄球菌 7 株(6.19%)为 MRSA 菌株, 106 株(93.81%)为 MSSA 菌株。

表 1 金黄色葡萄球菌 *mecA* 与 MLST 分型管家基因引物序列
Table 1 Primer sequences of *mecA* and MLST typing genes in *Staphylococcus aureus*

基因名称	引物序列	片段大小 /bp
<i>mecA</i>	F: GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA	310
	R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	
<i>arcC</i>	F: TTGATTACCCAGCGCGTATTGTC	456
	R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	F: ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	R: GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
<i>gmk</i>	F: ATCGTTTTATCGGGACCATC	417
	R: TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	R: GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	F: TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402
	R: TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	F: CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	R: CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	
<i>glpF</i>	F: CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	R: TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	



注: A1~A7: 7 株携带 *mecA* 基因金黄色葡萄球菌菌株扩增结果; M: 标记条带(size marker), SA25、SA66、SA86、SA87、SA88、SA104、SA106: *mecA* 阳性菌株编号。

图 1 *mecA* 基因 PCR 扩增图

Fig.1 Amplification figure of *mecA* gene by PCR

2.2 MLST 分型结果

113 株金黄色葡萄球菌中共检出 24 种 ST 型。113 株中, 81 株可分型, 32 株由于部分管家基因缺失不可分型, 各分型检出率详见表 2。ST1、ST398、ST7、ST59 为本研究优势 ST 型, 优势检出型别中 ST1 是全球流行的医院获得性分型^[11]、ST398 是社区人群和动物流行分型^[12]、ST7、ST59 分别是亚太地区动物、临床及社区相关感染优势分型^[13], 提示食源性金黄色葡萄球菌污染主要来自人及动物。检出的 5 种新分型: ST6656、ST6688、ST6709、ST6745、ST6754 中, ST6656 来自致死性金黄色葡萄球菌感染^[14]、新生儿社区感染^[15]相关分型 ST188 的“*pta*”管家基因发生点突变; ST6745 和 ST6754 分别来自医院获得性 MRSA 菌株^[16]的代表分型 ST59 的“*aroE*”“*glpF*”基因点突变; ST6688、ST6709 分别来自猪和牛群^[17-18]中主要流行分型 ST7 的“*pta*”“*arcC*”管家基因的重组(表 3), 新 ST 型的产生均来自现有 ST 分型的管家基因碱基突变或重新排列组合。细菌在不同环境压力下进化的方式多样, 本研究中发现的 5 个新 ST 型别中与 ST188、ST59 相关的新 ST 型是由于管家基因发生点突变, 与 ST7 相关的新 ST 型是由于管家基因间的组合发生变化, 新 ST 型的致病和传播流行情况尚待进一步研究。

2.3 28 种肠毒素/类肠毒素检出结果

113 株金黄色葡萄球菌中, 检出 24 种肠毒素/类肠毒素基因, 4 种(*see*、*ses*、*set*、*selz*)未检出。各肠毒素/类肠毒素检出情况详见表 4, 形成 24 种毒力谱见表 5。*selw* (100%、113/113)、*selx* (85.84%、97/113)、*sea* (33.63%、38/113)、*seq* (23.01%、26/113)、*sek* (22.12%、25/113)检出率较高。*sea*~*see* 5 种经典肠毒素基因检出率为 0%~33.63%, *selw* 检出率为 100%, *selx* 为 85.84%, *selw* 和 *selx* 编码于核心基因组^[19-20], 其检出率显著高于其他肠毒素/类肠毒素。其他新型肠毒素/类肠毒素检出率在 0~23.01%之间, 导致食品安全事故发生的新型肠毒素 *seh*、*sej*^[5,21-22]在本研究中检出率分别为 15.04%、0.88%, 可能成为本地区潜在致病风险。

2.4 PFGE 分型结果

113 株金黄色葡萄球菌聚类为 25 种 PFGE 分型, 96 株可分型, 各分型检出率详见表 6, 17 株未分型(见图 2)。113 株样本 PFGE 总聚类分析相似度为 54.4%~100%, 3 种优势带型聚类分析相似度为 87.2%~100%。J 型(29/113、25.66%)、H 型(11/113、9.73%)、I 型(9/113、7.96%)为优势带型, 总检出率占比 43.35, 其余 22 种散发带型检出率在 0.88%~4.24%之间。PFGE 分型结果显示, 本地区食源性金黄色葡萄球菌污染来源复杂, 优势菌株集中。

表 2 2009—2020 年北京市朝阳区 113 株食源性金黄色葡萄球菌 MLST 分子分型结果
Table 2 Results of MLST molecular typing of 113 foodborne *Staphylococcus aureus* strains in Chaoyang district of Beijing from 2009 to 2020

ST 分型	检出率(%)	ST 分型	检出率(%)	ST 分型	检出率(%)
ST1	15/113 (13.27)	ST72	1/113 (0.88)	ST2631	1/113 (0.88)
ST5	3/113 (2.65)	ST97	3/113 (2.65)	ST3055	2/113 (1.77)
ST6	6/113 (5.31)	ST188	2/113 (1.77)	ST4567	1/113 (0.88)
ST7	10/113 (8.85)	ST398	11/113 (9.73)	ST6656*	1/113 (0.88)
ST9	1/113 (0.88)	ST464	2/113 (1.77)	ST6688*	1/113 (0.88)
ST15	4/113 (3.54)	ST943	1/113 (0.88)	ST6709*	1/113 (0.88)
ST25	1/113 (0.88)	ST2026	1/113 (0.88)	ST6745*	2/113 (1.77)
ST59	9/113 (7.96)	ST2114	1/113 (0.88)	ST6754*	1/113 (0.88)

注: *为本研究上传至公共数据库的新 MLST 分型。

表 3 食源性金黄色葡萄球菌新检出 MLST 分型
Table 3 New MLST typing of foodborne *Staphylococcus aureus*

序号	MLST 分型	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmK</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
1	ST6656	3	1	1	8	804*	1	1
2	ST6745	19	973*	15	2	19	20	15
3	ST6754	19	23	863*	2	19	20	15
4	ST6688	5	4	1	4	455	6	3
5	ST6709	8	4	1	4	4	6	3

注: *为本研究上传至公共数据库的新管家基因。

表 4 2009—2020 年北京市朝阳区 113 株金黄色葡萄球菌 28 种肠毒素/类肠毒素基因检出率

Table 4 Detection rates of 28 kinds of enterotoxins/enterotoxin-likes genes in 113 *Staphylococcus aureus* strains from 2009 to 2020 in Chaoyang district of Beijing

基因	检出率(%)	基因	检出率(%)	基因	检出率(%)	基因	检出率(%)
<i>sea</i>	38/113 (33.63)	<i>seh</i>	17/113 (15.04)	<i>seo</i>	10/113 (8.85)	<i>selv</i>	10/113 (8.85)
<i>seb</i>	14/113 (12.39)	<i>sei</i>	11/113 (9.73)	<i>sep</i>	14/113 (12.39)	<i>selw</i>	113/113 (100)
<i>sec</i>	5/113 (4.42)	<i>sej</i>	1/113 (0.88)	<i>seq</i>	26/113 (23.01)	<i>selx</i>	97/113 (85.84)
<i>sed</i>	1/113 (0.88)	<i>sek</i>	25/113 (22.12)	<i>ser</i>	1/113 (0.88)	<i>sey</i>	17/113 (15.04)
<i>see</i>	0/113 (0)	<i>sel</i>	5/113 (4.42)	<i>ses</i>	0/113 (0)	<i>selz</i>	0/113 (0)
<i>tsst-l</i>	2/113 (1.77)	<i>sem</i>	11/113 (9.73)	<i>set</i>	0/113 (0)	<i>sel27</i>	1/113 (0.88)
<i>seg</i>	11/113 (9.73)	<i>sen</i>	11/113 (9.73)	<i>selu</i>	11/113 (9.73)	<i>sel28</i>	1/113 (0.88)

表 5 2009—2020 年北京市朝阳区 113 株食源性金黄色葡萄球菌携带肠毒素/类肠毒素毒力谱

Table 5 Enterotoxins/enterotoxin-likes virulence profiles of 113 foodborne *Staphylococcus aureus* strains in Chaoyang district, Beijing from 2009 to 2020

序号	肠毒素/类肠毒素毒力谱	检出率(%)	MLST 分型
1	<i>c-d-g-i-l-m-n-o-r-u-v-w-x</i>	1/113 (0.88)	ST5
2	<i>a-b-g-i-m-n-o-q-u-v-w-x-y</i>	1/113 (0.88)	ST5
3	<i>a-b-c-tsst-l-g-i-k-l-m-n-q-u-w</i>	1/113 (0.88)	ND
4	<i>g-i-m-n-o-u-v-w-x-y-27-28</i>	1/113 (0.88)	ST9
5	<i>c-tsst-l-g-i-l-m-n-o-u-v-w-x</i>	1/113 (0.88)	ST72
6	<i>b-g-i-m-n-o-u-v-w-x</i>	2/113 (1.77)	ST25(1) ND(1)
7	<i>g-i-m-n-o-u-v-w-x-y</i>	1/113 (0.88)	ST2631(1) ND(1)
8	<i>g-i-m-n-o-u-v-w-x</i>	3/113 (2.65)	ST5(1) ST2026(1) ND(1)
9	<i>a-b-k-q-w-x-y</i>	3/113 (2.65)	ST59(3)
10	<i>b-k-q-w-x-y</i>	5/113 (4.42)	ST59(2) ST6745(2) ND(1)
11	<i>a-h-k-q-w-x</i>	13/113 (11.50)	ST1(12) ND(1)
12	<i>c-h-l-w-x</i>	2/113 (1.77)	ST1(2)
13	<i>p-w-x-y</i>	1/113 (0.88)	ST7
14	<i>a-p-w-x</i>	1/113 (0.88)	ND
15	<i>b-k-q-w</i>	1/113 (0.88)	ST398
16	<i>k-q-w-x</i>	2/113 (1.77)	ST464(2)
17	<i>b-w-y</i>	1/113 (0.88)	ST188
18	<i>h-w-y</i>	2/113 (1.77)	ST1(1) ST7(1)
19	<i>w-x-y</i>	5/113 (4.42)	ST59(4) ST6754(1)
20	<i>a-w-x</i>	18/113 (15.93)	ST6(6) ST2114(1) ND(11)
21	<i>p-w-x</i>	12/113 (10.62)	ST7(7) ST6688(1) ST6709(1) ND(3)
22	<i>a-w</i>	1/113 (0.88)	ST398
23	<i>w-x</i>	22/113 (19.47)	ST7(1) ST15(4) ST97(3) ST188(1) ST398(2) ST943(1) ST3055(2) ST6656(1) ND(7)
24	<i>w</i>	13/113 (11.50)	ST398(7) ST4567(1) ND(5)

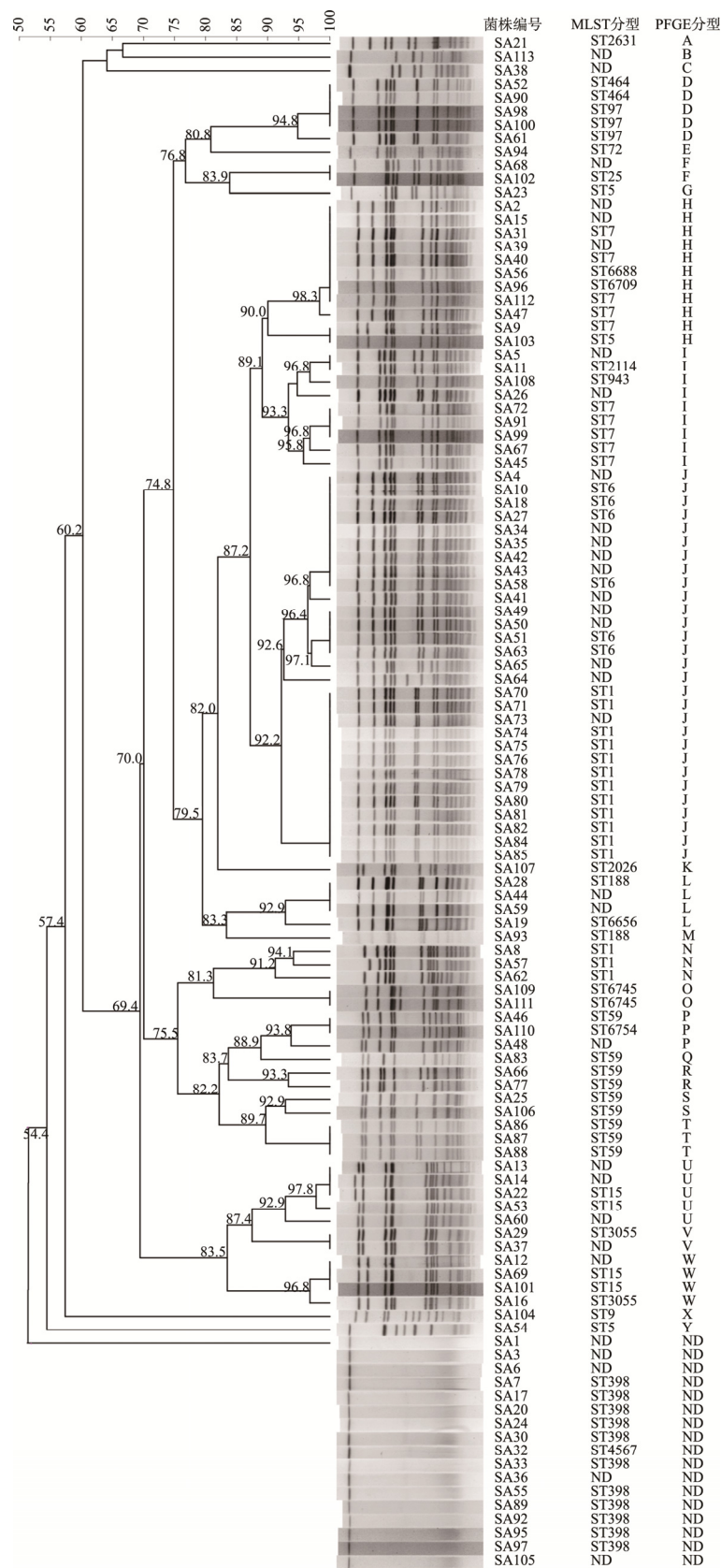
注: ND 表示未分型。

表 6 2009—2020 年北京市朝阳区 113 株食源性金黄色葡萄球菌 PFGE 分子分型结果

Table 6 PFGE molecular typing results of 113 foodborne *Staphylococcus aureus* strains in Chaoyang district of Beijing from 2009 to 2020

PFGE 分型	检出率(%)	PFGE 分型	检出率(%)	PFGE 分型	检出率(%)
A 型	1/113 (0.88)	J 型	29/113 (25.66)	S 型	2/113 (1.77)
B 型	1/113 (0.88)	K 型	1/113 (0.88)	T 型	3/113 (2.65)
C 型	1/113 (0.88)	L 型	4/113 (3.54)	U 型	5/113 (4.24)
D 型	5/113 (4.24)	M 型	1/113 (0.88)	V 型	2/113 (1.77)
E 型	1/113 (0.88)	N 型	3/113 (2.65)	W 型	4/113 (3.54)
F 型	2/113 (1.77)	O 型	2/113 (1.77)	X 型	1/113 (0.88)
G 型	1/113 (0.88)	P 型	3/113 (2.65)	Y 型	1/113 (0.88)
H 型	11/113 (9.73)	Q 型	1/113 (0.88)		
I 型	9/113 (7.96)	R 型	2/113 (1.77)		

注: ND 表未分型。



注: ND 表未分型。

图 2 113 株食源性金黄色葡萄球菌 PFGE 聚类分析

Fig.2 PFGE cluster analysis of 113 foodborne *Staphylococcus aureus* strains

2.5 MLST、PFGE 分型及 28 种肠毒素/类肠毒素相关性分析结果

本研究检出 ST5 均携带了包含 *egc* 基因簇在内的 10 种以上不同的毒力谱, *egc* 基因簇在所有 ST5、ST25、ST9、ST2026、ST72、ST2631 中存在, 但在 ST59、ST7 中完全缺失; 80% (12/15) ST1 携带“*sea-seh-sek-seq-selw-selx*”肠毒素/类肠毒素基因毒力谱, 55.56% (5/9) ST59 携带“*seb-sek-seq-selw-selx-sey*”毒力谱, 63.64% (7/11) ST398 仅携带 *selw* 基因(表 5)。MLST 分子分型与肠毒素/类肠毒素基因携带的检出与相关性文献报道基本一致, ST1/CC1 菌株携带 *sea*、*seh*、*sek*^[17,23]; ST5 通常检出多种肠毒素且与 *egc* 基因簇关系密切^[24–26]; ST59 与 *seb*、*sek*、*seq* 同时检出^[27]; 动物源 ST398 通常仅携带 *selw*^[28]。本研究中 11 株 ST398、5 株未分型、1 株 ST4567 未能通过 *Sma*I 酶切获得 PFGE 分型结果, 可能是因为 ST398、ST4567 酶切位点发生甲基化^[29], 无法进行有效的酶切。这些未能按照常规方法获得 PFGE 分型的菌株尚需进一步的研究, 有报道显示可使用 *Xma*I 进行 PFGE 分型^[29], 但本实验室参照文献条件尚未成功获得 PFGE 分型, 尚待开展进一步研究。5 个新型别 ST6656、ST6745、ST6754、ST6688、ST6709 与原始株(ST188、ST59、ST7)在肠毒素/类肠毒素携带和 PFGE 分型方面无明显差异。相同 MLST 型别的金黄色葡萄球菌在携带肠毒素/类肠毒素毒力谱和 PFGE 分型等方面不完全相同。

3 结论与讨论

金黄色葡萄球菌相关研究大多单项聚焦耐药、分子分型或肠毒素/类肠毒素基因携带情况, 未见关于食源性金黄色葡萄球菌 MRSA 鉴定、MLST、PFGE 分子分型及 28 种肠毒素/类肠毒素基因携带的联合报道。本研究将 2009—2020 年食源性金黄色葡萄球菌的耐药性、分子分型以及 28 种肠毒素携带情况进行了综合分析, 研究发现, 食源性 MRSA 检出率仅为 6.19% (7/113), 远低于临床水平^[30], MLST 分子分型分析显示食源性金黄色葡萄球菌优势型别与人源菌株、牲畜源菌株一致, 证明食源性菌株污染来自动物^[31]或者饲养加工人员^[32–33]。在食品中新发现的 5 种金黄色葡萄球菌 MLST 型别分别由临床、社区、动物源最常见分型管家基因突变/重组而来, 金黄色葡萄球菌正在外界环境压力之下发生突变和进化。

随着新的肠毒素/类肠毒素不断被发现和证实能够引起食物中毒相关症状^[5,21–22], 菌株携带的肠毒素/类肠毒素毒力谱种类繁多, 仅常规检测 *sea-see* 5 种经典肠毒素无法涵盖金黄色葡萄球菌导致食品安全事故相关致病风险因子, 有必要扩大肠毒素检测种类和范围, 才能更精准地溯源食品安全事故致病原。根据我们对食源性金黄色葡萄球菌 28

种肠毒素/类肠毒素的结果分析, 可重点检测 *seh*、*sek*、*sep*、*seq*、*sey* 等携带率较高的肠毒素。

2009—2020 年北京市朝阳区 113 株金黄色葡萄球菌优势流行株是 ST1-MSSA-*sea-seh-sek-seq-selw-selx*。朝阳区食源性金黄色葡萄球菌污染来源复杂, 优势菌株集中。仅对金黄色葡萄球菌经典肠毒素的检测和 PFGE 的溯源不能完全满足精准医疗时代的需求扩大肠毒素检测范围, 将毒素基因携带与 MLST 和 PFGE 有效结合进行确切溯源分析具有重要的公共卫生学意义。

参考文献

- [1] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, (1): 64–70.
- [2] FU P, WANG LS, CHEN J, *et al.* Analysis of surveillance data of foodborne disease outbreaks in mainland China in 2015 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, (1): 64–70.
- [3] SUGIYAMA H, HAYAMA T. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey [J]. *J Infect Dis*, 1965, 115(4): 330–336.
- [4] LV G, JIANG R, ZHANG H, *et al.* Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* from food samples and food poisoning outbreaks in Shijiazhuang, China [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 652276.
- [5] LI H, TANG T, STEGGER M, *et al.* Characterization of antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* from retail foods in Beijing, China [J]. *Food Microbiol*, 2021, 93: 103603.
- [6] CIUPESCU LM, AUVRAY F, NICORESCU IM, *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains and evidence for the involvement of non-classical enterotoxin genes in food poisoning outbreaks [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny139
- [7] WILLYARD C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 15.
- [8] HE Y, REED S. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2069: 79–88.
- [9] ENRIGHT MC, DAY NP, DAVIES CE, *et al.* Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1008–1015.
- [10] GEHA DJ, UHL JR, GUSTAFERRO CA, *et al.* Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(7): 1768–1772.
- [11] 郝民, 王恒伟, 邵希凤, 等. 北京市朝阳区食物中毒相关金黄色葡萄球菌病原学分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 6246–6250.
- [12] HAO M, WANG HW, SHAO XF, *et al.* Pathogenic analysis of *Staphylococcus aureus* associated with food poisoning in Chaoyang district, Beijing [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(17): 6246–6250.
- [13] CABOCLO RM, CAVALCANTE FS, IORIO NL, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one [J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41(3): 21–26.
- [14] HUIJSDENS XW, VAN-DIJK BJ, SPALBURG E, *et al.* Community-

- acquired MRSA and pig-farming [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006, 5: 26.
- [13] CHENG VCC, WONG SC, CAO H, *et al*. Whole-genome sequencing data-based modeling for the investigation of an outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit in Hong Kong [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(3): 563–573.
- [14] THAI SN, THU HVT, KIM LVT, *et al*. Antimicrobial resistance profile and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized adults in three regions of Vietnam [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2020, 73(3): 193–200.
- [15] DONG Q, LIU Y, LI W, *et al*. Phenotypic and molecular characteristics of community-associated *Staphylococcus aureus* infection in neonates [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 4589–4600.
- [16] LI S, SUN S, YANG C, *et al*. The changing pattern of population structure of *Staphylococcus aureus* from bacteremia in China from 2013 to 2016: ST239-030-MRSA replaced by ST59-t437 [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 332.
- [17] SEINIGE D, ALTROCK AN, KEHRENBURG C. Genetic diversity and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from wild boars [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2017, 54: 7–12.
- [18] LI T, LU H, WANG X, *et al*. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 127.
- [19] OKUMURA K, SHIMOMURA Y, MURAYAMA SY, *et al*. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 404.
- [20] WILSON GJ, SEO KS, CARTWRIGHT RA, *et al*. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10): e1002271.
- [21] JOHLER S, GIANNINI P, JERMINI M, *et al*. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(3): 997–1004.
- [22] BIANCHI DM, GALLINA S, BELLIO A, *et al*. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2014, 58(2): 190–196.
- [23] CHEN D, SONG Q, XU Z, *et al*. Characterization of enterotoxin A-producing *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 531–538.
- [24] HE C, XU S, ZHAO H, *et al*. Leukotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene backgrounds in bloodstream and wound *Staphylococcus aureus* isolates from eastern region of China [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 395.
- [25] FESSLER AT, KADLEC K, HASSEL M, *et al*. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(20): 7151–7157.
- [26] 张林吉, 张小荣, 曹永忠. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因与 MLST 及 spa 分子克隆相关性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(5): 449–456.
- ZHANG LJ, ZHANG XR, CAO YZ. Study on the correlation between *Staphylococcus aureus* enterotoxin gene and molecular cloning of MLST and spa [J]. *Chin J Pathog Biol*, 2018, 13(5): 449–456.
- [27] LIANG B, MAI J, LIU Y, *et al*. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from women and children in Guangzhou, China [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2790.
- [28] VRIELING M, TUFFS SW, YEBRA G, *et al*. Population analysis of *Staphylococcus aureus* reveals a cryptic, highly prevalent superantigen SEIW that contributes to the pathogenesis of bacteremia [J]. *mBio*, 2020, 11(5): e02082.
- [29] BOSCH T, DE-NEELING AJ, SCHOULS LM, *et al*. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398 [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 40.
- [30] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(4): 377–387.
- HU FP, GUO Y, ZHU DM, *et al*. CHINET China bacterial resistance surveillance in 2020 [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2021, 21(4): 377–387.
- [31] SASAKI Y, SAKURADA H, YAMANAKA M, *et al*. Effectiveness of ear skin swabs for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs at abattoirs [J]. *J Vet Med Sci*, 2021, 83(1): 112–115.
- [32] ZHANG L, GAO J, BARKEMA HW, *et al*. Virulence gene profiles: Alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 63.
- [33] 张鹏飞, 徐旭, 王婷. 肉鸡屠宰环节中金黄色葡萄球菌的流行及分子特征和耐药性研究[J]. *食品科学*, 2021, 8: 1–13.
- ZHANG PF, XU X, WANG T. Study on the prevalence, molecular characteristics and drug resistance of *Staphylococcus aureus* in the slaughter of broilers [J]. *Food Sci*, 2021, 8: 1–13.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



王琦, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与环境卫生。
E-mail: btmwangqi@163.com



宋衍燕, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与环境卫生。
E-mail: songyanyancdc@163.com