

文章编号 1006-8147(2015)01-0084-03

论 著

双重 PCR 检测沙门氏菌和变形杆菌方法的建立

郇娟¹, 戈红雨², 张成龙¹, 韩双羽¹, 师伟¹, 王玉宝¹

(1. 天津医科大学第二医院感染性疾病研究所, 天津 300211; 2. 天津医科大学总医院感染科, 天津 300052)

摘要 目的: 建立快速鉴定腹泻患者粪便标本中沙门氏菌和变形杆菌的双重聚合酶链式反应(PCR)方法。方法: 针对沙门氏菌属特异基因 *invA* 和变形杆菌属特异基因 *tuf* 分别设计特异性引物, 将天津某医院肠道门诊腹泻患者粪便标本经 SS 培养基分离培养后, 对可疑菌株同时进行 *invA-tuf* 基因双重 PCR 鉴定和生化鉴定, 比较两种方法结果的一致性; 对沙门氏菌进一步行血清学分型。结果: 双重 PCR 和生化反应都各自鉴定得到沙门氏菌 31 株和变形杆菌 62 株, 而且二者鉴定结果完全一致; 31 株沙门氏菌包括鼠伤寒、肠炎等常见血清型和格兰扁、菲尔摩雷等罕见血清型, 均能扩增出 283 bp 长度片段, 62 株变形杆菌包括 48 株奇异变形杆菌、8 株普通变形杆菌、2 株潘氏变形杆菌、4 株产黏液变形杆菌, 均能扩增出 541 bp 长度片段。结论: *invA-tuf* 基因双重 PCR 方法能够快速可靠地鉴定 SS 培养基上生长的沙门氏菌和变形杆菌。

关键词 沙门氏菌; 变形杆菌; 双重 PCR; 生化反应

中图分类号 R372

文献标志码 A

Establishment of double PCR method for detection of *Salmonella* and *Proteus*

HUAN Juan¹, GE Hong-yu², ZHANG Cheng-long¹, HAN Shuang-yu¹, SHI Wei¹, WANG Yu-bao¹

(1. Institute of Infection Disease, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Department of Infection Disease, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To develop a double PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* and *Proteus* isolated from stool samples of patients with diarrhea. **Methods:** Based on the *invA* gene in *Salmonella* and the *tuf* gene in *Proteus*, 2 pairs of primers were designed. The stool samples of diarrhea patients in the diarrhea outpatient clinic of a hospital in Tianjin were collected for the culture on the *Salmonella Shigella* agar after which double PCR and biochemical identification were carried out simultaneously with the suspected colonies. The consistency of the two methods was evaluated. The serological typing was carried out for *Salmonella*. **Results:** Thirty-one strains of *Salmonella* and 62 strains of *Proteus* were detected by double PCR and biochemical identification respectively, and the results were identical for the two methods. The 31 strains of *Salmonella* included both the common serotypes (e.g. S.Typhimurim and S.Enteritidis) and rare serotypes (e.g. S.Grampian and S.Fillmore). 283 bp and 541 bp fragments were obtained for all *Salmonella* and 62 strains of *Proteus* (48 *P.mirabilis*, 8 *P.vulgaris*, 2 *P.pennneri* and 4 *P.myxofaciens*), respectively. **Conclusion:** The *invA-tuf* double PCR assay could make rapid and reliable identification of the *Salmonella.spp* and *Proteus.spp* isolated on the *Salmonella Shigella* agar.

Key words *Salmonella*; *Proteus*; double PCR; biochemical tests

食源性疾病是全球重要的公共卫生问题之一, 对人类的健康危害已引起人们高度关注。自 1996-2010 年 FoodNet 数据报告显示沙门氏菌已经成为食源性细菌性致病菌所致死亡的首因^[1]。变形杆菌也是导致食源性疾病的常见病原菌之一, 其导致的食物中毒数量位居前列^[2]。在选择性分离培养沙门氏菌的 SS 培养基(*Salmonella Shigella* agar)上, 变形杆菌亦可生长, 而且菌落颜色、形态与沙门氏菌有相似之处, 可致混淆。鉴定沙门氏菌属的多价血清和因子血清能够与少数变形杆菌发生交叉凝集, 引起鉴定困难^[3]。因此, 需要进行繁琐费时的完整生化

反应鉴定才能将二者正确区分。*invA* 和 *tuf* 分别是沙门氏菌属和变形杆菌属特异基因, 本研究尝试建立 *invA-tuf* 双重 PCR 方法, 期望能快速可靠地鉴别这两种食源性病原菌。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 研究所用菌株均分离自 2013 年 5 月-10 月我院肠道门诊腹泻患者粪便标本中。质控菌株大肠杆菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 为本研究所保存。

1.2 主要仪器 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司)、脉冲场凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)、GelDoc XR 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)、DYY-6D 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.3 主要试剂 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)为北

基金项目 天津市卫生局科研基金资助项目(2013KZ112)

作者简介 郇娟(1988-), 女, 硕士在读, 研究方向: 细菌耐药及致病机制; 通信作者: 王玉宝, E-mail: wyb2046@163.com。

京陆桥公司产品,SS 琼脂为杭州天和微生物试剂有限公司产品,API20E 生化试剂条和 0.85%NaCl 为法国梅里埃公司产品,沙门氏菌诊断血清为泰国 S&A 公司产品。Premix Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准 DL-2000、电泳缓冲液均购自大连宝生物 Takaba 生物工程公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,*invA* 和 *tuf* 基因引物序列分别选自参考文献[4-5],序列分别为:

invA-F CTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATT

invA-R AGTTTCTCCCCCTCTTCATGCGTTACCC

tuf-F AAATTGTTGAATTAGCAGAAGCA

tuf-R GCGATTGGGTGGATCAGTTC

引物扩增的目的基因 *invA* 片段长度大小为 283 bp,扩增的 *tuf* 基因片段长度为 541 bp。

1.4 菌株分离与培养 细菌培养分离与生化鉴定严格按《全国临床检验操作规程》(第3版)操作。取适量腹泻患者粪便标本用亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)增菌,37℃增菌 16 h 后,取增菌培养液一环接种于 SS 培养基上,37℃培养过夜。

1.5 菌株的鉴定 挑取 SS 培养基上的中等大小、中心黑色的圆形菌落进行纯培养,将纯培养的菌落同时进行双重 PCR 和生化鉴定。

1.5.1 双重 PCR 鉴定 煮沸法提取菌株基因组 DNA,反应体系为 *invA* 和 *tuf* 基因的上、下游引物各 1 μL,TaqDNA 聚合酶 12 μL,模板 DNA 1 μL,加灭菌去离子水至 25 μL。反应条件:94℃预变性 5 min 后,进行如下循环 30 次:94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 40 s;终末延伸 5 min。反应结束后取 5 μL 1%琼脂糖凝胶电泳,电压 120 V,电泳约 30 min,以 DNA 标志物 DL2000 为参照,用凝胶成像仪成像观察结果。大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 为阴性质控菌株。随机选取 1 株沙门氏菌 1317 和 1 株变形杆菌 1224 的扩增产物测序,将序列在 GenBank 进行同源性比对。

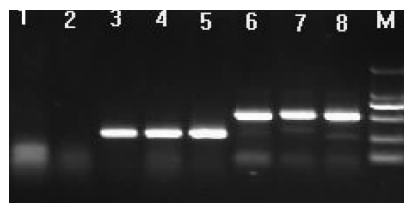
1.5.2 菌株的生化鉴定 挑取纯培养后的单个菌落接种于 API20E 生化试剂条,于 37℃培养 20 h 后观察结果。

1.6 沙门氏菌的血清学鉴定 沙门氏菌的血清学鉴定步骤按照泰国 S&A 公司提供的沙门氏菌血清诊断操作步骤进行,依照沙门氏菌抗血清诊断附录和沙门氏菌检验国家标准(GB/T4789.4-2010),根据测定得到的抗原式确定沙门氏菌的血清型。

2 结果

2.1 双重 PCR 鉴定结果 可疑菌落进行双重 PCR 鉴定,有 31 株菌扩增出 283 bp 长度的片段,判定为

沙门氏菌,随机选取的沙门氏菌 1317 的扩增产物测序,与 Genbank 中 *invA* 基因序列一致性为 100%;有 62 株菌扩增出 541 bp 长度的片段,判定为变形杆菌,随机选取的变形杆菌 1224 的扩增产物测序,与 Genbank 中的 *tuf* 基因序列有 99%的一致性。部分 PCR 结果如图 1 所示。



泳道 1、2 分别为阴性对照菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853;3~5 分别为沙门氏菌 1809、868、1317;6~8 为变形杆菌 880、879、1224;M 为 maker DL2000

图 1 部分沙门氏菌和变形杆菌双重 PCR 产物电泳结果

Fig 1 Electrophoresis results of PCR products of partial *Salmonella* and *Proteus*

2.2 生化鉴定结果 可疑菌落经生化鉴定,有 31 株为沙门氏菌,与双重 PCR 鉴定结果完全一致;有奇异变形杆菌 48 株、普通变形杆菌 8 株、潘氏变形杆菌 2 株、产黏液变形杆菌 4 株,共计变形杆菌 62 株,与双重 PCR 鉴定结果完全一致。

2.3 沙门氏菌血清学鉴定结果 31 株沙门氏菌血清分型共涉及 5 个血清群、11 个血清型,具体见表 1。

表 1 沙门氏菌的血清型分布情况

Tab 1 Distribution of serotypes of *Salmonella*

血清型	所属群	菌株数
Typhimurium(鼠伤寒)	O:4(B)群	7
Enteritidis(肠炎)	O:9(D1)群	5
Agona(阿贡纳)	O:4(B)群	4
Derby(德尔卑)	O:4(B)群	3
Senftenberg(山夫登堡)	O:1,3,19(E4)群	3
Fillmore(菲尔摩雷)	O:8(C2-C3)群	2
Braenderup(布伦登卢普)	O:9(D1)群	2
Monterideo(蒙得维的亚)	O:7(C1)群	2
Grampian(格兰扁)	O:7(C1)群	1
Oritamerin(奥里塔曼林)	O:7(C1)群	1
Mbandaka(姆班达卡)	O:7(C1)群	1

3 讨论

目前食源性致病菌的检测方法多种多样,既有传统的分离培养法,也有聚合酶链式反应、基因芯片等,各有利弊。例如,传统的分离培养法中,沙门氏菌和变形杆菌在 SS 培养基上的菌落都可以呈现为圆形、扁薄、半透明,中间黑色,但是如果依靠人为主观区分,可造成误判。个别奇异变形杆菌与沙门氏菌具有共同的抗原,可以与沙门菌属 A-F 多价

血清、因子血清 O19 发生强凝集反应,增加了菌株鉴定困难。根据沙门氏菌检验国家标准 (GB/T4789.4-2010),沙门氏菌的生化鉴定操作步骤多,大约需要 2~4 d 才能完成,并且不能与变形杆菌完全区分开来,故检测沙门氏菌和变形杆菌采用生化鉴定方法时,应使用全套生化反应试剂,因而耗时费力,不利于协助临床及时判断病情。

沙门氏菌 *invA* 基因核苷酸序列高度保守,为属特异性基因^[6],编码吸附和侵袭上皮细胞的表面抗原。Rahn 等^[7]以其为靶基因用 PCR 方检测沙门氏菌,检出率为 97%,所用的引物经过不断的优化,目前检出率可达 100%。变形杆菌属 *tuf* 基因也具有高保守性^[8],用于检测变形杆菌效果良好^[9]。本研究采用了 *invA-tuf* 双重 PCR 方法,经过与生化反应对比,二者鉴定结果完全一致,没有发现 PCR 结果阴性的标本其生化鉴定结果阳性,而且 PCR 方法明显节约时间。痢疾杆菌和致病性大肠杆菌等也是重要的食源性致病菌,其在 SS 培养基上的菌落形态、大小、颜色与沙门氏菌、变形杆菌明显不同,可以从培养基上区分开来,不会对 PCR 结果造成干扰。

本组沙门氏菌不仅有常见的鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、阿贡那沙门氏菌等血清型,还有格兰扁、菲尔摩雷和奥里塔曼林沙门氏菌等国内罕见报道的血清型,均可以扩增出 283 bp 的特异条带。而本组变形杆菌包含了奇异、普通、潘氏、产黏液 4 个菌种,也都能扩增出 541 bp 的特异条带。这进一步证实了本研究采用的靶基因有很好的敏感性和特异性,*invA-tuf* 双重 PCR 方法能够快速可靠地区分和鉴定沙门氏菌和变形杆菌,对于尽早指导临床诊断和治疗有很好的帮助。

值得注意的是,极其微量的污染即有可能造成 PCR 扩增假阳性的产生,因此要有严格的质量控制

并且认真遵守操作规程。还有一些报道采用 PCR 方法对食品或粪便直接检测病原菌,具有快速和灵敏的特点。但是考虑到抗菌药物药敏试验以及基因分型等溯源需求,PCR 方法尚不能完全取代传统的培养方法。

(感谢中国疾病预防控制中心腹泻病室对本研究提供的支持和帮助)

参考文献:

- [1] Barton B C, Jones T F, Vugia D J, et al. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005[J]. J Infect Dis, 2011, 204(2): 263
- [2] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅.2003-2007 年中国 1060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J].中国食品卫生杂志,2010,22(3): 224
- [3] 王锦彤,钟广辉,熊定凯,等.珠江水中检出与沙门氏菌具有共同抗原的奇异变形杆菌[J].口岸卫生控制,2008,13(2):23
- [4] Dione M M, Ikumapayi U, Saha D, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal[J]. J Infect Dev Ctries, 2011, 5(11): 765
- [5] 毕水莲,唐书泽,陈守义,等.食源性变形杆菌属 PCR 检测方法[J].食品研究与开发,2010,31(2):155
- [6] Suez J, Porwollik S, Dagan A, et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans[J]. PLoS One, 2013, 8(3): 58449
- [7] Rahn K, De Grandis S A, Clarke R C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(4): 271
- [8] Paradis S, Boissinot M, Paquette N, et al. Phylogeny of the enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(5): 2013
- [9] 王慧,朱瑞良,谭燕玲,等.多重 PCR 检测三种重要食源性致病菌方法的建立及应用[J].中国农业科学,2011,44(11):2334

(2014-07-24 收稿)