

葡萄球菌腸毒素 Real-time PCR 方法的建立

蘇勳璧、王昱嵐、邱秀櫻、蔡金來、周振英

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

葡萄球菌之特性

葡萄球菌 (Staphylococci) 為球形或橢圓形細菌，直徑約 0.4–1.2 μm ，平均約 0.8 μm 。此菌生長時許多菌體會凝聚在一起，在顯微鏡下排列呈一串串葡萄，故稱為葡萄球菌。此菌菌體無芽胞及鞭毛不能運動，一般不形成孢子，為革蘭氏陽性細菌，但如培養時間過久可能變為革蘭氏陰性。此菌廣泛分佈於空氣、土壤、水、食品、食具及健康人的皮膚、手、鼻咽、鼻腔等處。葡萄球菌有特殊的生物特性：(1) 可以發酵多種醣類，產酸但不產氣；(2) 對熱、乾燥有抵抗力，乾燥環境裡可存活數月，加熱 80°C、30 分鐘才能殺死 (3) 耐鹽性強，在濃度高達 10 至 15% 含鹽培養基內仍可生長；(4) 對磺氨類藥物非常敏感，但有多數菌株已產生耐藥性。葡萄球菌致病力的強弱，主要決定於毒力因子的多樣性，毒力因子分為三類：(1) 毒素：細胞毒素 (α 、 β 、 γ 、 σ 及殺白血球素(Leucocidin)、溶血素(Hemolysin)、皮膚壞死素和致死毒素(Lethal toxin)等)、中毒性休克症候群毒素 (Staphylococcal Toxic Shock Syndrome, STSS)、腸毒素 (Enterotoxin A、B、C、D、E...等)；(2)

酶類：凝血酶(Thrombin.)、纖維蛋白溶解酶(Plasmin)、耐熱核酸酶(heat-stable nuclease)、透明質酸酶(Hyaluronidase)、脂酶(Lipase)等；(3) 其他：莢膜、細胞壁聚糖等。50%金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 會產生腸毒素。腸毒素對熱穩定，煮沸 30 分鐘仍不被破壞，對腸道內酵素也有抵抗力。腸毒素須加熱至 100°C 持續 2 小時才會被破壞，故在有烹調溫度下仍能引起食物中毒。在碳水化合物以及蛋白質食品上生長時容易產生腸毒素，這是金黃色葡萄球菌造成食品中毒的原因。要引起金黃色葡萄球菌腸毒素中毒必須具備以下條件：(1)食物中被帶有產腸毒素葡萄球菌大量污染；(2)污染後食品放置於適合產毒溫度下；(3)有足夠潛伏期；(4)食物成分和性質適於細菌生長繁殖和產毒。誤食腸毒素後潛伏期約 1 至 7 小時，常見的中毒症狀為流涎、反胃、噁心、嘔吐、腹部絞痛及腹瀉，1-2 天即可回復^{1,2,3}。

金黃色葡萄球菌腸毒素 (Staphylococcal enterotoxins, SEs) 是一群結構類似，分子量相近 (22-30 KDa)，等電點介於 6.8 到 8.6，且為抗熱性、耐寒性高的蛋白質，100°C 加熱 20 分鐘亦不能破壞腸毒素，在 4°C 經 67 日仍不被破壞，在 -70°C 冰凍可長期保存。整個分子由多個 β -sheets 及數個 α -sheets 所組成，內有一個雙硫鍵，並含大量 Lysine、Aspartic acid 和 Tyrosine。SEs 根據血清學的方法可分為 SEA 到 SEJ，其中 SEC 又可分為 SEC1、SEC2、SEC3，此三者間胺基酸序列相似度約 92%。其中原來命名為 SEF，現改稱為 Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)。各型腸毒素均可發生食物中毒，以腸毒素 A 型(53%)所佔比例最大，其毒力也最強，攝入 1 μ g 即能引起中毒；D 型(5%)所佔比例居次，依次為 C、B、E 型。有些產毒菌株可產生一種以上腸毒素，而混合型中以 A、D 型(18%)最多，C、D 型(9%)居次^{3,4,5,6,7}。

依據衛生署統計食品中毒案件中金黃色葡萄球菌佔第二位，但金黃色葡萄球菌有否產生腸毒素，為其致病力的重要指標，食品中毒案件雖非法定傳染病，但常造成社會事件及影響國人健康，故疾病管制局歷年來亦對食品中

毒案件加以監控，故本中心仍針對金黃色葡萄球菌腸毒素建立 PCR 檢測方法。

材料與方法

菌株來源：分析檢測試驗共使用金黃色葡萄球菌 32 株菌株，分別有 8 株來自 ATCC (ATCC 13567, 8095, 13566, 14458, 13566, 19095, 23235 及 27664,)及 11 株來自 BCRC (BCRC13962, 12657, 13963, 13826, 13828, 12657, 12656, 10783, 10789, 12156, 12655)的參考菌株，及 13 株臨床分離株，這些臨床株由 89-93 年間的食物中毒案件中所分離，由其中挑選包含欲檢測之毒素型別的菌株供分析試驗；其中陰性對照參考菌株包括不產毒金黃色葡萄球菌，*S. epidermidis*，*S. hominis*，*E. faecalis* 等。冷凍保存的菌株先行培養於選擇性培養基 Baird-Parker，經由確認並挑選特徵菌落 37°C 隔夜（18-20 小時）培養於 TSA (Difco, USA)及 BHI broth(Difco, USA)。

腸毒素檢測：隔夜培養之菌液(BHI broth)經由 3,000 rpm 離心 20 分鐘後，取上清液作為腸毒素之檢測用。腸毒素之偵測使用 SET-RPLA (Staphylococcal Enterotoxin Reversed Passive Latex Agglutination, ABCD) 及 ENTERTO-X-F (Staphylococcal Enterotoxin Reversed Passive Latex Agglutination, ABCDE) 商品套組 (Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Japan)。偵測毒素之操作依據試劑之檢驗操作說明進行，經由稀釋之上清液與經抗體 (antisera to SEA-SEE) 敏感化的乳膠試劑混合均勻於 96 孔盤反應孔中，室溫隔夜反應後判讀結果；偵測中並同時進行毒素 A-E 之陽性對照試驗，及陰性對照組試驗。

DNA 萃取：菌株基因體 DNA 萃取以 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行。取一個接種環的菌體溶解於 180 µl ATL 緩衝液及 20 µl proteinase K，56°C 水浴槽震盪作用 3 小時，DNA 萃取依照套組操作說明進行，最後 DNA 洗提於 150 µl AE 緩衝液。

Real-time PCR 分析：Real-time PCR 分析所使用的引子與探針見表

一。反應總體積 25 μ l；SEA-D 基因偵測之 real-time PCR 試劑使用 Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)，primer 600 nm，taqman probe 150 nm，萃取之 DNA 10 μ l 為反應模板；SEE 基因偵測之 real-time PCR 試劑則使用 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, USA)，primer 600 nm，DNA 模板 10 μ l。反應在 ABI PRISM 7,000 sequence detection system 進行，PCR 試驗反應條件為：50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，45 個循環之 95°C 15 秒及 60°C 1 分鐘，。

敏感度分析：菌液由 1.5×10^8 CFU/ml 濃度(McFaland No. 0.5)進行序列稀釋至 1.5×10^1 (15)CFU /ml。將各點稀釋菌液進行二重複之PCR分析。

特異性分析：將每一株待測參考菌株、臨床株及陰性對照菌株，分別都與五組的毒素基因 A-E 引子與探針組進行交叉反應試驗，每株菌依此至少進行二重複之交叉測試，經分析得其結果。

結果

本實驗參考Klotz (2003) 和Becker (1998) 的文獻資料進行測試^{6,7}。由反應分析結果顯示將Ct 值 35 定為cutoff值時，可以很清楚的區分有無特異性PCR擴增反應，故以此標準進行金黃色葡萄球菌腸毒素基因A-E的偵測試驗。Real-time PCR擴增反應結果圖示於圖一。參考菌株毒素基因（含陰性對照株）和其他組引子及探針間，反覆進行至少二次以上之交叉試驗，結果顯示依據所使用之操作條件與引子探針等可以有效的偵測出腸毒素基因（如表二），以此條件進行臨床株的測試，也可以同樣有效且正確的進行偵測（如表三）。

敏感度分析試驗中顯示，以 real-time PCR 偵測其毒素基因的有效偵測（Ct cutoff of 35）限度約可達到 1500 CFU，單一微小菌落之微量菌體足以供其檢測。而特異性分析試驗中顯示，以 real-time PCR 法檢測 SEs 的特異性達 90%以上，陰性對照菌株不管以任何一組的引子與探針反應結果皆為陰性。

在時程的比較上，傳統腸毒素測定法最快要四日才能偵測毒素分泌與型別；但以 **real-time PCR** 檢測基因可在有單一菌落時，經 DNA 萃取當日即可得知結果。

結論

傳統腸毒素測定法中以 **RPLA** 方法最廣為使用，但傳統腸毒素測定法最快要四日才能偵測毒素分泌與型別，且操作繁複耗時及試劑購買不易，而 **real-time PCR** 檢測基因可在當日即可得知結果，可符合臨床上判斷疾病嚴重程度的及時性；但 **real-time PCR** 檢測結果，只能證明此菌株上帶有腸毒素基因，並不能代表此段基因即會分泌腸毒素，這也或許是檢測 19 株參考菌株時，在 **real-time PCR** 和 **RPLA** 方法中 **SEB** 和 **SED** 有不同結果之故。

依據衛生署統計從 1995 至 2001 年台灣食物中毒平均年發生例約 105 件，中毒人數平均年發生人數約 1,440 人，其中金黃色葡萄球菌佔第二位，平均年發生例約 26 件⁸，故開發金黃色葡萄球菌腸毒素**Real-PCR**檢測方法，有其防疫業務的需求。疾病管制局任務為快速阻斷疫情漫延，以保障國人健康，而加強防疫檢驗能力，不斷開發新的檢驗項目，為控制疫情重要的技術。

參考文獻

- 1、Hilson GR, Elek SD. An investigation into the development of gram-negative rods in penicilin-treated cultures of *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol. 1959 ;21:208-20.
- 2、Johnson AD, Spero L, Cades JS, et.al. Purification and characterization of different types of exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 1979 ;24:679-84.
- 3、Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 ;31:63-76.
- 4、Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol.

- 2000 ;1:1-10.
- 5、Spero L, Metzger JF. Staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Methods Enzymol.* 1981;78:331-6.
 - 6、Klotz M, Opper S, Heeg K, et.al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4683-7.
 - 7、Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal Enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin gene. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 2548-53.
 - 8、<http://www.doh.gov.tw/statistic/data/>

表一、*Staphylococcus aureus*腸毒素之Real-time PCR試驗使用的primers及Taqman probes^a

Gene	Primer or probe	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
SEA	SEA-F	AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT	92
	SEA-R	TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA	
	Probe	FAM-AACGAATAAGAAAAATGTAAGTTCAGGAGTTGGATC	
SEB	SEB-F	ACACCCAACGTTTTAGCAGAGAG	81
	SEB-R	CCATCAAACCAGTGAATTTACTCG	
	Probe	FAM-CAACCAGATCCTAAACCAGATGAGTTGCACA	
SEC1	SEC-F	AATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA	80
	SEC-R	ATCAAAATCGGATTAACATTATCCATTC	
	Probe	FAM-TAGAAGTCCACCTTACAACAA	
SED	SED-F	TGATTCTTCTGATGGGTCTAAAGTCTC	115
	SED-R	GAAGGTGCTCTGTGGATAATGTTTT	
	Probe	FAM-TATGATTTATTTGATGTAAAGGGTGATTTTCCCGAA	
SEE	SEE-F	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178
	SEE-R	TAACCTACCGTGGACCCCTC	

^aSEA-D⁶; SEE⁷

表二、以 RPLA 及 real-time PCR 檢測 *Staphylococcus aureus* 參考菌株 SEs 之結果

Toxin phenotype	Reference strains	No. of strains	No. of positive strains detected by :		
			SET-PRLA	ENTERTOX-F	Real-time PCR
SEA	ATCC:13567,8095,13566 BCRC:13962,12657	5	5	5	5
SEB	ATCC:14458,13566 BCRC:13963	3	3	3	5
SEC1	ATCC:19095 BCRC:13826,13828	3	3	3	3
SED	ATCC:23235 BCRC:12657	2	2	2	3
SEE	ATCC:27664 BCRC:12656	2	-#	2	2
Nonproducer*	BCRC:10783,10789,12156 12655	4	0	0	0

* non-toxigenic *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, and *E. faecalis*

SET-RPLA detects SEA-D

表三、以 RPLA 及 real-time PCR 檢測 *Staphylococcus aureus* 臨床菌株 SEs 之

結果

Toxin phenotype	No. of strains	No. of positive strains detected by :		
		SET-PRLA	ENTERTOX-F	Real-time PCR
SEA	4	4	4	4
SEB	3	3	3	3
SEC1	3	3	3	3
SED	1	1	1	1
SEE	0	-#	0	0
Nonproducer*	2	0	0	0

* clinical isolates of non-toxigenic *S. aureus*, and *S. epidermidis*

SET-RPLA detects SEA-D

圖一、Real-time PCR 檢測 Staphylococcal enterotoxin (SE)基因結果圖

