

食品中金黄色葡萄球菌 检测方法研究进展

杨蓉生¹, 王小玲², 唐俊妮^{1*}

(1.西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041;

2.西南民族大学电气信息工程学院, 四川成都 610041)

摘要:金黄色葡萄球菌是引起食物中毒的重要致病菌之一。检测食品中金黄色葡萄球菌对于预防和控制金黄色葡萄球菌引起的食物中毒具有重要意义。论述和分析了传统培养方法、传统检测方法的改进、免疫学方法、以分子生物学为基础的快速检测方法以及商业化快速检测方法。

关键词:金黄色葡萄球菌; 检测方法; 食品

Research progress on detection methods of *Staphylococcus aureus* in food

YANG Rong-sheng¹, WANG Xiao-ling², TANG Jun-ni^{1*}

(1.College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2.College of Electrical & Information Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the major pathogenic bacteria in food poisoning. The detection of *S.aureus* in food plays an important role in preventing and controlling food poisoning caused by *S.aureus*. The conventional detection methods, the improved methods, the immunological methods, the methods by using modern molecular biological techniques, and commercial detection methods used in *S.aureus* detection were introduced and analyzed.

Key words: *Staphylococcus aureus*; detection methods; food

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0459-03

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 在 1884 年首次被发现, Rosenbach 在固体培养基上培养出葡萄球菌^[1], 并在同年记录了它能引起食物中毒。1930 年, 研究人员又明确指出金黄色葡萄球菌引起食物中毒与其产生的肠毒素有关, 据估计, 进食者摄入约 100ng 的肠毒素 A 即可出现中毒症状。典型的金黄色葡萄球菌呈球型, 直径为 0.8 μ m 左右, 显微镜下排列成葡萄串状, 无芽胞、鞭毛, 大多数也无荚膜, 属于革兰氏阳性细菌。目前, 随着国际食品贸易不断发展, 食品中致病微生物检测方法的研究也在不断向前发展。除了传统的培养方法之外, 近年来, 人们采用免疫学、生物化学和分子生物学等先进技术进行了食品中致病微生物快速检测方法的研究。对于金黄色葡萄球菌也不例外, 传统的检测方法主要采用细菌分离培养及生化鉴别, 免疫学方法(如: 酶联免疫、免疫转印、乳胶凝集等方法) 因其快速、操作简便, 逐步应用于食品卫生检测。但新的分子生物学技术已显示出其

在食品卫生检测方面的独特优势。现将国内外有关金黄色葡萄球菌检测方法研究进展介绍如下。

1 传统培养方法

传统和标准的食品微生物学分析(GB 4789.10-2010)^[2] 金黄色葡萄球菌主要依赖于前增菌培养、分离培养、菌落形态观察和一系列的生化鉴定以及血清型鉴定等步骤。如将食物样品首先接种于 7.5% 氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤培养基内, 进行增菌培养 24h, 然后转种于血平板和 Baird-Parker 平板上划线分离培养 24h, 再挑取 Baird-Parker 黑色的菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶实验。血浆凝固酶实验用新鲜兔血浆, 放入小试管中, 加入培养 24h 的金黄色葡萄球菌肉浸液肉汤培养物, 振荡摇匀, 放在温箱或水浴内, 每半小时观察一次, 观察 6h, 如呈现凝固, 即将试管倾斜或倒置时, 呈现凝块者, 被认为呈阳性结果, 同时以已知阳性和阴性葡萄球菌株及肉汤作为对照。进行肠毒素的检测, 全程需时大概 4~8d, 方法繁琐。

2 传统检测方法的改进

近年来, 已有许多商品化的快速鉴别培养基、小型生理生化鉴别系统出现。鉴别培养基主要利用

收稿日期: 2010-12-20 * 通讯联系人

作者简介: 杨蓉生(1959-), 女, 实验师, 研究方向: 食品检验。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071515); 中央高校基本科研业务费专项(09NZYJ04)。

金黄色葡萄球菌的生化特性设计,可用于食品中金黄色葡萄球菌的快速检测,如美国的3M公司生产的金黄色葡萄球菌快速检测试纸片 Petrifilm Rapid *S.aureus* method(3M)和 *Staphylococcus* Hand Checker(Sani-tech)等,其特点是快速和操作简便,适用于大量食物样品的快速检测,但准确度有限,一般作为推测性实验,还需用其它方法进一步证实。小型生理生化鉴别系统(如国产的微量生化鉴别管、Biomerieux的API系统、Oxiod的Replianalyzer等)采用各种鉴别培养基制成系列化的微量试剂盒。

3 免疫学检测方法

金黄色葡萄球菌自身具有多种蛋白质抗原,其中肠毒素(如SEA、SEB、SEC1、SEC2、SEC3、SED、SEE)和SPA经常用于金黄色葡萄球菌的检测^[3]。以抗体为基础的金黄色葡萄球菌检测方法大致有5~6种,如:酶联免疫吸附法、反向被动胶乳凝集法、放射免疫测量法、反向血凝实验、显微玻片凝胶双扩散法等,后几种方法较为费时、麻烦、灵敏度也较差,而且要求有专门的技术和工具,在使用中不易掌握和现场检测。随着科学的进步,检测手段也日益先进,肠毒素的检测方法日益趋于快速、简便和高灵敏。研究发现,改变反向胶乳凝集法中的离心重力加速度 g 的作用及时间,可以很好地减少检测时间,从原来的20~28h,减少到4~6h;如果在这种方法中使用磁性颗粒和磁力来加速胶乳颗粒的沉降,将是一种很有发展前途的方法。酶联免疫吸附法是目前新近推出的比较实用的检测方法之一。酶联免疫吸附法是将酶分子与抗体分子联合结成酶标记分子,当与固相免疫吸附剂中相应的抗原或抗体、或抗原抗体结合物相遇时形成酶抗原-抗体结合物,加入酶底物,结合物中的酶水解底物,使无色的底物溶液生成有色的反应产物。根据颜色的深浅,即可测出溶液中的抗原(或抗体)的量。酶联免疫吸附法又分为直接法和间接法两种,由澳大利亚进口的酶联法试剂盒(TECRA)属间接法,用已知的抗原吸附在固相载体上,与待检的肠毒素标本中的抗原作用,再加入酶标记抗同种动物抗体的免疫球蛋白(抗抗体),使之与特异抗原抗体复合物中的抗体作用,加入酶底物,产生的颜色反应与标本中的肠毒素抗原量成正比^[4]。

尽管免疫学方法目前运用的较为广泛,但对于一些新近出现的肠毒素,如:SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN和SEO等,目前还没有商业化的检测系统。这样一来,以分子生物学为基础的方法就发挥着独特的优势。

4 以分子生物学为基础的快速检测方法

随着分子生物学的不断发展,在病原微生物检测和研究方面,PCR技术成了除上述方法之外的很好选择。PCR技术具有快速、特异性强、灵敏度高、检测限低以及可以成为自动化的趋势等优点,与传统方法相比,PCR的这些优点不断地鼓舞着人们去使用和研究。PCR在食品微生物诊断和食源性疾病的鉴定应用上有许多文献报道^[5]。基于PCR的基本原理,许多学者充分发挥创造性思维,对PCR技术进行

研究和改进,使PCR技术得到了进一步完善。例如,在一个反应管中使用多套引物,针对多个DNA模板或同一模板的不同区域进行扩增的过程称之为多重PCR,可以满足同时分析不同DNA序列的需要,尤其是在致病菌的检测和科学研究时,在一个反应管中能够同时检测多种目标DNA,不仅能够节省实验样品,而且能使以往繁琐的操作变得省时省力。PCR技术的另一个飞跃是荧光PCR,这项技术由美国Applied Biosystems公司于1995年推出,不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃,而且与常规PCR相比,特异性更强、自动化程度更高,并能有效解决PCR污染问题,目前已得到较为广泛的应用。荧光PCR技术是指在普通PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累检测整个PCR反应进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量的一种方法。荧光PCR技术在常规PCR基础上,添加了一条标记有两个荧光基团的探针。一个标记在探针的5'端,称为荧光报告基团(R);另一个标记在探针的3'端,称为荧光抑制基团(Q)。两者可构成能量传递结构,即5'端荧光基团所发出的荧光可被3'端的荧光抑制基团吸收或抑制。当二者距离较远时,抑制作用消失,报告基团荧光信号增强,这就是荧光共振能量转移(FRET,Fluorescent Resonance Energy Transfer)原理。荧光信号与PCR产物同比增长,随PCR产物的增加而增强,荧光PCR方法就是利用此原理,在PCR反应过程中连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。荧光PCR检测体系常用的荧光探针基本分为三种类型: TaqMan探针、分子信标(molecular beacon)和荧光杂交探针。荧光PCR集扩增和检测于一体,直接闭管测定,无须分离和冲洗,操作简便快速,容易自动化,杜绝了产物污染源,并采用实时检测,大大提高了定量的准确性。

PCR技术检测金黄色葡萄球菌所选用的靶基因主要有:肠毒素基因(sea,seb,sec,sed,see,seg,seh,sei,sej);耐热核酸酶基因(nuc);凝固酶基因(coa);抗性基因(mecA,femA,ermA,ermB,ermC,ereA,ereB,aacA-aphD,tetK,tetM,vatA,vatB,vatC等);16S rRNA基因;影响生物被膜形成基因,如icaADBC等^[6-9]。用于食品中检测金黄色葡萄球菌的靶基因主要是肠毒素基因和耐热核酸酶基因(nuc),耐热核酸酶基因具有特异性好的特点,自从PCR技术诞生,人们就一直应用nuc基因来检测金黄色葡萄球菌。文献报道1991年PCR技术开始用于金黄色葡萄球菌检测,当时Wilson首次根据entB、entC1和nuc基因序列检测金黄色葡萄球菌^[10]。1992年,Brakstad根据nuc基因检测金黄色葡萄球菌^[11]。1993年,Chesneau报道了利用耐热核酸酶基因特异性检测金黄色葡萄球菌^[12]。1996年,Piotr等人根据nuc基因和mecA基因,应用多重PCR快速检测抗甲氧西林的金黄色葡萄球菌^[13]。1997年,Saruta等应用巢式PCR对金黄色葡萄球菌进行快速检测和分型^[14]。2000年以后,多重PCR检测技术和实时定量PCR技术在金黄色葡萄球菌检测中发挥着重要的作用,如:Tamarapu发展了多重PCR检测乳制品中的金黄色葡

萄球菌^[15]; Chen 等应用实时荧光 PCR 检测奶中的金黄色葡萄球菌^[16]; Fischer 等应用定量实时 PCR 和免疫方法相结合检测金黄色葡萄球菌肠毒素^[17]。由此可见,利用多重 PCR 和实时荧光 PCR 技术是检测金黄色葡萄球菌的发展趋势。

5 商业化快速检测方法

随着研究的深入,许多快速检测方法已经商品化,这些新的快速检测系统缩短了传统检测方法的时间,而且能够较快得到检测结果,操作相对简单。利用生理生化的特性制造的试剂盒,如法国梅里埃公司生产的 RPF 试剂盒和 API 检测系统等。利用免疫分析法和免疫荧光法制造的检测试剂盒,如 Staphylococcus VIA (TECRA)、Staphylococcus ET VIA (TECRA)、Staphylase (Oxoid)、VIDAS-ST ET (bioMerieux Vitek) 和 Transia Tube SET test (GENE-TRAK) 等。利用免疫胶乳微粒凝集实验发展起来的快速检测试剂盒,如 SET-RPLA (Unipath Ltd.)、Staph-Rapid Test (Roche, Basel)、Staphyflex (Unipath Ltd.)、Slidex Staph kit (bioMerieux Vitek)、Staphylococcus Latex (Hardy Diagnostics)、Monostaph (Bionor A/S.)、Rida-Screen (R-Biopharm GmbH Darmstadt.)、DRYSPOT Staphylect Plus (Oxoid)、Staphylect (Oxoid)、Slide Agglutination test (Becton Dickinson)。基于 DNA 检测的试剂盒也已诞生,如: Accuprobe S.aureus (GenProbe Inc.)、GENE-TRAK Colorimetric (GENE-TRAK) 和 TAQMAN (PE Applied Biosystems)。这些方法操作简单但检测成本十分昂贵,我国极少拥有自己的知识产权,因此研究开发具有我国自主知识产权的快速自动检测系统是国内科学工作者的研究重点。

6 展望

传统的检测方法已经越来越不能适应现代化大规模检测的需要,快速检测方法的研究势在必行。目前各种快速检测方法所依托的科技基础主要来自两个方面,一是免疫学方面的知识,主要采用免疫学中抗原抗体特异性反应和免疫学方法中高灵敏度等特性;另一方面是来自分子生物学技术的发展,PCR 是这一类快速检测方法的核心。快速检测技术实用性总体趋势是灵敏、快速、特异、操作简便,其发展趋势应该是多学科交叉和多项高新技术的整合。今后一项性能优越且具有竞争力的病原微生物快速检测技术可能要运用分子生物学、免疫学、电化学、生物信息学和计算机科学等多学科的原理及知识。如利用生物芯片技术和免疫学技术进行检测,利用生物传感技术对检测结果进行信号转换,利用计算机技术对检测结果进行分析比较,利用网络技术进行信息交流,这正是我们所期待的。

参考文献

[1] George Y Liu, Anthony Essex, John T Buchanan, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity [J]. *JEM*, 2005, 202(2): 209-215.
[2] GB 4789.10-2010 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[S].

[3] Vernozy - Rozand C, Mazuy - Cruchaudet C, Bavai C, et al. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(6): 490-494.
[4] 袁桂兴, 温剑. 金黄色葡萄球菌的快速检测方法 [J]. *生物技术通讯*, 2007(6): 75-78.
[5] Rijpens NP, Herman LM. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens [J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(4): 984-995.
[6] Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, et al. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(2): 112-119.
[7] Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food [J]. *Health Technol Assess*, 2007, 11(36): 211-216.
[8] Barken KB, Haagensen JA, Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 384(1-2): 1-11.
[9] Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance [J]. *APMIS*, 2004, 112(11-12): 815-837.
[10] Wilson IG, Cooper JE, Gilmour A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(6): 1793-1798.
[11] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(7): 1654-1660.
[12] Chesneau O, Allignet J, Solh N. Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of *Staphylococcus aureus* [J]. *Mol Cell Probes*, 1993, 7(4): 301-310.
[13] Barski P, Piechowicz L, Galiński J, et al. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR [J]. *Mol Cell Probes*, 1996, 10(6): 471-475.
[14] Saruta K, Matsunaga T, Kono M, et al. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 146(2): 271-278.
[15] Tamarapu S, McKillip JL, Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products [J]. *J Food Prot*, 2001, 64(5): 664-668.
[16] Chiang YC, Fan CM, Liao WW, et al. Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence [J]. *J Food Prot*, 2007, 70(12): 2855-2859.
[17] Fischer A, von Eiff C, Kuczius T, et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins [J]. *J Mol Med*, 2007, 85(5): 461-469.