

通报:国卫办应急发〔2014〕15号〔A〕. 2014-02-14.

[13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会办公厅. 国家卫生计生委办公厅关于2014年全国食物中毒事件报告情况的通报:国卫办应急发〔2015〕9号〔A〕. 2015-02-11.

[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会办公厅. 国家卫生计生委办公厅关于2015年全国食物中毒事件报告情况的通报:国卫办应急发〔2016〕5号〔A〕. 2016-02-19.

[15] 中华人民共和国国务院食品安全委员会办公室. 全国食品安全形势稳定向好〔N〕. 人民日报, 2017-09-23(04).

[16] 国家食品药品监督管理总局. 食品药品监管总局就2016年食品安全抽检信息及2017年抽检计划举行发布会〔EB/OL〕. (2017-01-16)〔2017-11-13〕. http://www.china.com.cn/zhibo/2017-01/16/content_40096430.htm.

[17] 李光辉,孙思胜,郭卫芸,等. 2009—2015年全国食物中毒特征分析〔J〕. 食品工业,2017,38(6):205-207.

研究报告

温州市食品中金黄色葡萄球菌污染状况及分子流行病学特征研究

谢爱蓉,上官智慧,胡玉琴,洪程基,李毅
(温州市疾病预防控制中心,浙江温州 325000)

摘要:目的 了解温州市食品中金黄色葡萄球菌的污染状况,分析分离的金黄色葡萄球菌的耐药性、毒力基因分布及脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型特征。方法 依据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》进行菌株分离鉴定,采用纸片法进行药敏试验,mini-VIDAS法和聚合酶链式反应(PCR)法分别进行肠毒素及其基因的检测,PFGE法进行分子分型。结果 4类食品388份样品中有16份样品检出金黄色葡萄球菌,检出率为4.12%,其中生畜肉和生禽肉检出率较高,分别为13.89%(5/36)和11.11%(4/36)。所有菌株均有不同程度的耐药,对青霉素耐药率最高(100.00%,16/16),其次为红霉素(56.25%,9/16),多重耐药率为18.75%(3/16),未检出对甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌肠毒素及其基因检测阳性率均为56.25%(9/16),其中*seb*、*seg*基因检出率较高,均为37.50%(6/16)。PFGE图谱分为12种PFGE带型。结论 金黄色葡萄球菌在温州市食品中存在一定的污染率,且具有分子多态性、产肠毒素率及毒素基因携带率较高的特征,提示存在潜在的食品安全隐患。

关键词:金黄色葡萄球菌;耐药性;肠毒素基因;分子分型;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)03-0249-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2018.03.006

Contamination and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in food in Wenzhou
XIE Ai-rong, SHANGGUAN Zhi-hui, HU Yu-qin, HONG Cheng-ji, LI Yi
(Wenzhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

Abstract: Objective To investigate *Staphylococcus aureus* contamination in food in Wenzhou, and to analyze the drug resistance, enterotoxin genes distribution and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. **Methods** According to GB 4789.10-2010 National Food Safety Standard Food Microbiological Examination: *Staphylococcus aureus*, the strains were isolated and identified. The Kirby-Bauer method was used in drug sensitivity test. Mini-VIDAS and polymerase chain reaction (PCR) were used to detect the *Staphylococcus aureus* enterotoxin and its genes. All strains were subtyped by PFGE. **Results** Four categories of 388 samples were collected. Sixteen *Staphylococcus aureus* strains were isolated with a positive rate of 4.12% and livestock meat and poultry meat got the highest detection rate as 13.89% (5/36) and 11.11% (4/36), respectively. All strains were antibiotic-resistant to at least one drug, and the resistant rate to penicillin was the highest (100.00%, 16/16), followed by erythromycin (56.25%, 9/16), and 18.75% (3/16) strains displayed multi-drug resistance. No methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was detected. The prevalence rates were 56.25% (9/16) in enterotoxin and its genes, among which *seb* and *seg* gene were more frequently found

收稿日期:2018-02-09
基金项目:温州市科技局公益性科技计划项目(Y20150316)
作者简介:谢爱蓉 女 主管技师 研究方向为微生物检验 E-mail: sharonxar@aliyun.com
通信作者:李毅 男 副主任技师 研究方向为微生物检验 E-mail: zjwzliyi@126.com

37.50% (6/16). The 16 isolates were divided into 12 PFGE patterns. **Conclusion** The food was contaminated by *Staphylococcus aureus* to some degree in Wenzhou. Foodborne *Staphylococcus aureus* isolated in Wenzhou showed molecular polymorphism and strong enterotoxin-producing ability. The prevalence rates of enterotoxin gene was high, which may result in potential risks to food safety.

Key words: *Staphylococcus aureus*; drug resistance; enterotoxin gene; molecular typing; foodborne pathogenic bacteria

金黄色葡萄球菌广泛存在于自然环境中,是一种常见的食源性致病菌,金黄色葡萄球菌污染食物所导致的食源性疾病已成为世界性食品安全问题。美国每年由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件数量占细菌性食物中毒事件的 33%^[1-2],而我国金黄色葡萄球菌及其毒素亦是引发细菌性食物中毒的主要致病因子之一^[3]。金黄色葡萄球菌众多的毒素及耐药性的不断增强,给其防治带来极大的挑战。为了解温州市食品中金黄色葡萄球菌污染水平,本研究对温州市市售生畜肉、生禽肉、鱼饼以及奶粉样品进行监测,并对分离出的金黄色葡萄球菌进行耐药性、致病性和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型研究,建立其相关资料的数据库,为今后更好地预防和控制由金黄色葡萄球菌引起的食源性疾病的发生提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2016 年 3 ~ 11 月,在温州市 11 个县市区所设监测点内的各农贸市场、超市等场所,采集生畜肉、生禽肉、鱼饼各 36 份,奶粉样品 280 份,共计 388 份样品,每份约 500 g。

1.1.2 主要仪器与试剂

mini-VIDAS 小型全自动荧光酶联免疫分析仪、VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统均购自法国生物梅里埃,T100 型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪、CHEF Mapper 型脉冲场凝胶电泳仪、Gel XR 型凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad,Qsep100 全自动核酸分析系统[中国台湾 BIOPTIC(光鼎)]。

MH 琼脂、7.5% 氯化钠肉汤均购自青岛海博生物制品有限公司,抗菌药敏纸片(英国 Oxoid),mini-VIDAS SET2(法国生物梅里埃),PCR 试剂、*Sma* I 酶、*Xba* I 酶均购自日本 Takara,溶葡萄球菌酶(美国 Sigma),SeaKem Gold 琼脂(瑞士 Lonza),预制胶卡夹[中国台湾 BIOPTIC(光鼎)]。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定

所有样品参照 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》^[4]第一法进行检测,分离菌株经 VITEK 2 Compact 全自

动细菌鉴定及药敏分析系统鉴定。

1.2.2 药物敏感性试验

采用纸片法进行药敏试验,抗菌药物选取、结果判断、质量控制参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准^[5]进行。抗生素 A 组为红霉素、头孢西丁、青霉素、复方新诺明,B 组为利奈唑胺、四环素、强力霉素,C 组为氯霉素、环丙沙星和庆大霉素,U 组为呋喃妥因、甲氧苄啶。药敏试验质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 25923),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。

1.2.3 肠毒素检测

按 mini-VIDAS 全自动荧光酶联免疫分析仪操作手册进行。

引物设计与合成:引物参考 PELES 等^[6]报道的 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei*、*sej* 序列进行设计,由上海生工生物工程有限公司合成。

DNA 提取:增菌液 100 μ l,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 100 μ l DNA 提取液于沉淀中,振荡混匀。置 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 ~ 15 min。10 000 r/min 离心 1 min,取上清液作为肠毒素基因 PCR 检测模板。

基因扩增检测:PCR 反应体系为 50 μ l。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 Qsep100 全自动核酸分析系统进行检测分析。

1.2.4 PFGE 分子分型

按照《2015 年国家食源性疾病预防工作手册》^[7]进行。将获得的电泳图像用 BioNumerics Version 7.5 软件进行分析,用非加权配对算术平均(UPGMA)法进行聚类,构建聚类树,选用 Dice 系数估算菌株彼此之间相似性。

1.3 统计学分析

使用 Excel 软件录入数据,SPSS 23.0 软件进行统计分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 类食品中金黄色葡萄球菌的污染情况

388 份样品中共有 16 份样品检出金黄色葡萄球菌,总检出率为 4.12%。生畜肉和生禽肉检出率

较高,分别为 13.89% (5/36) 和 11.11% (4/36),不同食品检出率差异有统计学意义($\chi^2 = 17.186, P < 0.05$)。奶粉样品中金黄色葡萄球菌检出率低于生畜肉和生禽肉,差异均有统计学意义($\chi^2 = 15.248, P < 0.05; \chi^2 = 10.025, P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同类别食品样品中金黄色葡萄球菌检出率

Table 1 Detection rate of *Staphylococcus aureus* isolated from different categories of food

食品类别	检测样品份数	阳性样品份数	检出率/%
鱼饼	36	2	5.56
生畜肉	36	5	13.89
生禽肉	36	4	11.11
奶粉	280	5	1.79
合计	388	16	4.12

2.2 金黄色葡萄球菌药物敏感试验结果

所有菌株对头孢西丁、复方新诺明、利奈唑胺、强力霉素、氯霉素、庆大霉素、呋喃妥因均敏感,对青霉素耐药率最高(100.00%, 16/16),其次为红霉素(56.25%, 9/16),见表 2。16 株耐药株呈现 6 种耐药谱,其中 5 株为单一耐药,8 株双重耐药,对 3 种及以上抗生素耐药的菌株有 3 株,多重耐药

表 2 金黄色葡萄球菌药物敏感试验结果

Table 2 Analysis of drug sensitivity test of *Staphylococcus aureus*

抗生素名称	敏感菌株数	中介菌株数	耐药菌株数	耐药率/%
红霉素	7	0	9	56.25
青霉素	0	0	16	100.00
四环素	13	1	2	12.50
环丙沙星	15	0	1	6.25
甲氧苄啶	14	0	2	12.50
其他	16	0	0	0.00

注:其他抗生素包括头孢西丁、复方新诺明、利奈唑胺、强力霉素、氯霉素、庆大霉素、呋喃妥因

率为 18.75% (3/16)。

2.3 金黄色葡萄球菌肠毒素及基因检测结果

对 16 株金黄色葡萄球菌进行肠毒素测定,同时采用 PCR 法进行 9 种肠毒素基因检测,2 种方法均检出 9 株阳性菌株,总检出率为 56.25%,见表 3。其中奶粉样品检测结果均为阳性,生禽肉均为阴性,而生畜肉及鱼饼阳性率分别为 60.00% (3/5)、50.00% (1/2)。毒素基因检测结果显示, *seb*、*seg* 基因检出率最高,均为 37.50% (6/16),共出现 6 种基因组合模式,以 *seb* + *seg* 基因型最高(18.75%, 3/16),同时检出 2 种及以上肠毒素基因的菌株占 43.75% (7/16)。

表 3 不同食品类别肠毒素及其基因型分布情况

Table 3 Distribution of enterotoxin and its genes isolated from the different categories of food

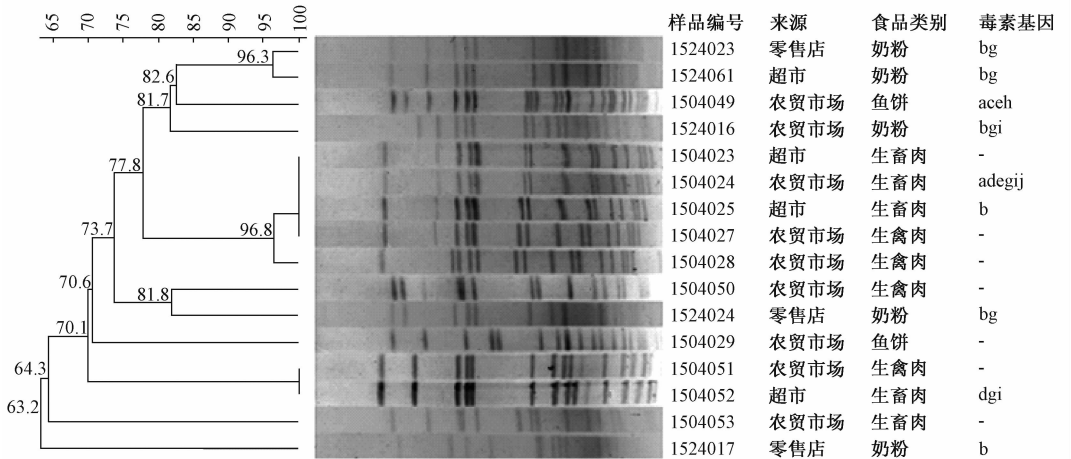
食品类别	毒力基因型						毒素基因 阳性菌株数	毒素阳性 菌株数
	aceh	adegij	b	bg	bgi	dgi		
奶粉	0	0	1	3	1	0	5	5
生畜肉	0	1	1	0	0	1	3	3
生禽肉	0	0	0	0	0	0	0	0
鱼饼	1	0	0	0	0	0	1	1
合计	1	1	2	3	1	1	9	9

注:aceh 表示 *sea* + *sec* + *see* + *seh*;adegij 表示 *sea* + *sed* + *see* + *seg* + *sei* + *sej*;b 表示 *seb*;bg 表示 *seb* + *seg*;bgi 表示 *seb* + *seg* + *sei*;dgi 表示 *sed* + *seg* + *sej*

2.4 PFGE 分子分型

16 株金黄色葡萄球菌分子型别呈多态性,经聚

类分析,其相似度为 63.2% ~ 100.0% ,分为 12 种 PFGE 型别,见图 1。其中 1504023、1504024、



注:aceh 表示 *sea* + *sec* + *see* + *seh*;adegij 表示 *sea* + *sed* + *see* + *seg* + *sei* + *sej*;b 表示 *seb*;bg 表示 *seb* + *seg*;bgi 表示 *seb* + *seg* + *sei*;dgi 表示 *sed* + *seg* + *sej*

图 1 金黄色葡萄球菌聚类分析结果

Figure 1 PFGE pattern of *Staphylococcus aureus*

1504025、1504027 为同一型别,1504051 与 1504052 为同一型别。从图 1 中可以看到 PFGE 图谱的聚集性并不明显,且型别相同的菌株,其食品类别及来源也未表现出菌株间的相关性。将 PFGE 型别与耐药谱及毒力基因结合分析,发现 PFGE 型别一致的菌株,它们的耐药谱及携带毒素基因的情况并不完全相同,显示它们之间的关联性并不明确。

3 讨论

本次调查显示,4 类食品中金黄色葡萄球菌检出率为 4.12%,提示温州市食品存在一定程度的金黄色葡萄球菌污染。其中生畜肉、生禽肉检出率分别达到 13.89%、11.11%,与巢国祥等^[8]报道结果(10.96%)相近,但低于索玉娟等^[9]报道的生肉类检出率(21.00%)。本研究表明食源性金黄色葡萄球菌有一定程度耐药,尤其是青霉素(100.00%)和红霉素(56.25%),并呈现 6 种耐药谱,多重耐药率为 18.75%,与国内外报道^[10-12]基本一致。不同地区不同食品类别耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株的分离率可能不同,张兰荣等^[13]报道的北京市通州区污染食品的金黄色葡萄球菌全部为 MRSA 菌株,而刘东香等^[14]对四川省动物性食品源金黄色葡萄球菌的耐药性分析中未检出 MRSA 菌株,在本研究中亦未检出 MRSA 菌株。

金黄色葡萄球菌引起的食物中毒往往是其肠毒素导致的,本研究中金黄色葡萄球菌肠毒素检测阳性率为 56.25%,其中奶粉和生畜肉产毒率较高,与贵州省^[15]、扬州市^[8]相关报道结果相近。金黄色葡萄球菌肠毒素类型众多,不同类型的金黄色葡萄球菌菌株肠毒素基因分布不同,本研究分离的 16 株金黄色葡萄球菌中,*seb*、*seg* 基因携带率较高。而沈玄艺等^[16]等从食品监测样品中分离的 96 株金黄色葡萄球菌及其肠毒素基因以 *sed* 型最多(37.5%)。汪永禄等^[17]则报道马鞍山市食品中分离的金黄色葡萄球菌肠毒素基因携带率最高的是 *seb*(25%)。张俊彦等^[18]发现在生牛奶分离株中 *sea* 基因比例最高,其他食品分离株则以 *sea*、*seb* 型为主。这些差异可能与地域分布以及分离菌株的食品种类有关。

本研究 16 株金黄色葡萄球菌分为 12 种 PFGE 型别,显示温州市食源性金黄色葡萄球菌基因型呈现多态性,可能与金黄色葡萄球菌流行广泛且流行时间较长,从而长期受到免疫压力有关。PFGE 型别与耐药谱及毒素基因之间的关联性并不明确,与王迪等^[11]、舒高林等^[19]的报道一致。通过对金黄色葡萄球菌的 PFGE 分型研究,完善了温州市金黄色葡萄球菌的 PFGE 数据库,对今后可能引发的食源性疾病流

行病学调查和溯源有着重要意义。同时,有关部门要加大监管力度,防止食品中金黄色葡萄球菌的污染,并加强对金黄色葡萄球菌的耐药性监测。

参考文献

[1] VIEIRA-DA-MOTTA O, FOLLY M, SAKYIAMA C C H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques[J]. Braz J Microbiol,2001,32(1):27-31.

[2] 高涛. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素及检测方法的研究进展[J]. 福建分析测试,2003,12(2):1775-1778.

[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会办公厅. 国家卫生计生委办公厅关于 2015 年全国食物中毒事件情况的通报:国卫办应急发[2016]5 号[A]. 2016-02-19.

[4] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌:GB 4789.10—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[5] CLSI. M100-S23 performance standard for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, 2013.

[6] PELES F, WAGNER M, VARGA L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary[J]. Int J Food Microbiol,2007,118(2):186-193.

[7] 国家食品安全风险评估中心. 2015 年国家食源性疾病监测工作手册[Z]. 2015.

[8] 巢国祥,焦新安,周丽萍,等. 食源性金黄色葡萄球菌流行特征、产肠毒素特性及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(8):904-907.

[9] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J]. 中国食品学报,2008,8(3):88-93.

[10] 刘伟,王菊光,谢利军,等. 127 株金黄色葡萄球菌产肠毒素特性和耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(13):2820-2822.

[11] 王迪,张晓媛,陈倩,等. 北京市食源性金黄色葡萄球菌耐药及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(5):428-434.

[12] NORMANNO G, LA SALADRA G, DAMBROSIO A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products[J]. Int J Microbiol,2007,115(3):290-296.

[13] 张兰荣,王连秀,张文利. 食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性分析[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(1):35-37.

[14] 刘东香,刘书亮,张晓利,等. 四川省动物性食品源金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中国兽医杂志,2009,45(5):6-8.

[15] 周黎,周倩,朱玫. 贵州省食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(22):3318-3320.

[16] 沈玄艺,宋启发,徐景野,等. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布研究[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(5):427-429.

[17] 汪永禄,张萍,陶勇,等. 不同来源金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药性检测分析[J]. 实用预防医学,2014,21(4):488-491.

[18] 张俊彦,张严峻,朱敏,等. 金黄色葡萄球菌食品分离株肠毒素基因型分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(6):1417-1418.

[19] 舒高林,牛恒彩,刘国蓉,等. 北京市昌平区食源性金黄色葡萄球菌药敏分析及分子流行病学特征研究[J]. 疾病监测,2015,30(9):770-775.