

综述

食源性金黄色葡萄球菌的危害及其快速检测方法研究进展

王韬^{1,2}, 李红娜¹, 袁飞¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

摘要:金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌, 可通过污染乳制品、肉制品等蛋白质或淀粉含量丰富的食品引起食物中毒, 还易引发人体局部化脓性感染、肺炎、心包炎等疾病, 严重时甚至会出现败血症。采用准确、高效的金黄色葡萄球菌检测方法, 是预防食源性金黄色葡萄球菌及食品安全质量控制的关键。金黄色葡萄球菌检测方法主要有免疫血清学检测技术、聚合酶链式反应检测技术和生物传感器检测技术等。本文总结了各类检测方法的核心技术特征和应用实例, 为食源性金黄色葡萄球菌的快速检测方法的研发和使用提供思路。

关键词:金黄色葡萄球菌; 免疫血清学检测技术; 聚合酶链式反应检测技术; 生物传感器检测技术

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2022)04-0856-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.04.035

Research progress on the detection method and hazards of foodborne *Staphylococcus aureus*WANG Tao^{1,2}, LI Hongna¹, YUAN Fei¹

(1. China Institute of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a common foodborne pathogen, which can cause food poisoning by polluting foods rich in protein or starch, such as dairy products and meat products, and it is also tend to cause local suppurative infection, pneumonia, pericarditis and even septicemia in severe cases. Accurate and efficient detection methods of *Staphylococcus aureus* are significant to improve food safety and quality control by avoiding food poisoning. The detection methods of *Staphylococcus aureus* are mainly immuno-serological technology, polymerase chain reaction technology and biosensor technology and others. In this paper, the technical characteristics and application examples of detection methods are summarized respectively to provide reference for the development and application of rapid detection methods for foodborne *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; immuno-serological technology; polymerase chain reaction; biosensor technology

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性杆状细菌, 广泛存在于自然界中, 被认为是最常见的食源性致病菌之一^[1-3]。随着金黄色葡萄球菌对抗生素耐药性的普遍增加, 多年来, 金黄色葡萄球菌已成为医院和社区面临严重威胁的复杂感染性疾病的主要原因^[4-6]。金黄色葡萄球菌

可引起人畜细菌性感染, 由于金黄色葡萄球菌能产生凝固酶, 可产生局部化脓性感染性疾病, 包括轻度皮肤和软组织感染, 如呼吸道、伪膜性肠炎、心内膜炎等^[7-8]; 还可以引起血液感染、脓毒症、中毒性休克综合征(Toxic shock syndrome, TSS)和其他系统性感染, 这些感染后果严重危害人类健康^[9-11]。在适当的条件下, 金黄色葡萄球菌能够产生对肠道具有破坏性的肠毒素, 并引起食物中毒, 主要是由受污染的食物引起, 如牛奶、肉类、鸡蛋和剩菜等^[12]。我国发布了《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》GB 29921—2021, 并制定了国家标准中金黄色葡萄球菌的限量标准。金黄色葡萄球菌污染可接受水平的最大安全限量值在各类食品产品类别中不应超过 100 CFU/g, 因此, 金黄色葡萄球菌的快速检测和鉴定是保证食品安全的关键。

本文回顾了国内外金黄色葡萄球菌引发的食

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2020JK012); “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1603500); “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1603606); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2019JK003)

作者简介: 王韬 女 硕士研究生 研究方向为食品安全

E-mail: 2506097325@qq.com

通信作者: 袁飞 女 研究员 研究方向为食品安全

E-mail: feiyuan@163.com

品安全问题及其流行病学特征,进而对现有金黄色葡萄球菌检测方法的技术特征进行了对比,以期为金黄色葡萄球菌检测方法的研发和应用提供参考。

1 金黄色葡萄球菌与食品安全

1880年,外科医生亚历山大·奥格斯顿(Alexander Ogston)在苏格兰阿伯丁的溃疡病患者中首次发现了金黄色葡萄球菌^[13]。金黄色葡萄球菌属于金黄色葡萄球菌属(葡萄球菌属);革兰氏染色阳性,直径 $0.8\ \mu\text{m}$,在显微镜下(需氧或厌氧)呈“串葡萄”状排列;在 $37\ ^\circ\text{C}$ 和 $\text{pH}7.4$ 下生长最适。血液琼脂平板上的菌落是厚、有光泽和圆形,直径为 $1\sim 2\ \text{mm}$ 。它们大多是溶血的,在血琼脂平板上的菌落周围形成一个透明的溶血环。此外,金黄色葡萄球菌不形成孢子或鞭毛,但具有荚膜,可以产生金黄色色素,并分解甘露醇。此外,还发现金黄色葡萄球菌的血浆凝固酶、乳糖发酵和脱氧核糖核酸检测呈阳性。

食源性疾病(Foodborne diseases, FBD)在世界范围内发生,对人体生命健康影响很大,是备受关注的国际问题^[14]。据近几年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)调查数据显示,全球每年近十分之一的患者因误食安全性较差的食物诱发疾病,每年由食源性疾病引发的疾病数量庞大,呈逐年增长的趋势^[15]。最常见和最重要的食源性疾病之一是金黄色葡萄球菌食物中毒(*Staphylococcus aureus* food poisoning, SFP),金黄色葡萄球菌菌体大量生长,可产生肠毒素。金黄色葡萄球菌产生的肠毒素可分为经典肠毒素和新鉴定肠毒素,经典肠毒素是引起SFP的主要原因(约占比95%)^[16]。呕吐、腹泻和恶心是SFP最常见的症状,严重时需住院治疗,如果没有及时就医有可能导致死亡。SFP事件常发生于世界各国,在美国每年有超过24万例食源性疾病是由金黄色葡萄球菌引起的^[17]。在中国由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒事件的20%~25%^[18]。

2 金黄色葡萄球菌的检测方法

2.1 免疫学检测技术

2.1.1 酶联免疫吸附试验

WOOD等^[19]对在某医院接受由金黄色葡萄球菌引起的儿童肌肉骨骼感染(Musculoskeletal infections, MSKI)治疗的所有符合条件的儿童进行了为期2年的研究,取急性期和恢复期血清,用酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测针对白细胞毒素AB(LukAB)的抗体,该方法可区分金黄色葡萄球菌感染和非金黄色葡萄球菌感染。KIM等^[20]

用ELISA检测特应性皮炎(Atopic dermatitis, AD)的肘窝冲洗液组织,结果显示血清可作为检测金黄色葡萄球菌胞外小泡(Extracellular vesicles, EVA)的来源。

2.1.2 胶体金

胶体金免疫层析条具有操作简单、快速、低成本、灵敏度高优点,特别适合大面积普查与基层检测,在食品安全控制系统和临床诊断中表现出巨大的应用潜力。NAGASAWA等^[21]基于双抗体夹层的形式,开发出金纳米颗粒-金黄色葡萄球菌单克隆抗体偶联物的免疫层析试制,用于快速方便的检测金黄色葡萄球菌。该试纸条的检出限和检出率分别为 $10^3\ \text{CFU/mL}$ 和98.7%,可用于食品中金黄色葡萄球菌的快速检测,10 min内肉眼可见结果。

2.2 核酸检测技术

2.2.1 多重PCR

多重PCR(Multiplex polymerase chain reaction, MPCR)技术以其高特异性、高灵敏度、快速响应等优点,在微生物检测中得到了越来越多的应用,它可以在单管中检测出多个靶点。TAO等^[22]建立了一种通用引物介导的MPCR技术检测金黄色葡萄球菌等细菌,已达到对其进行非定向筛查的目的。徐晓可等^[23]在确定是由金黄色葡萄球菌引起的疾病流行后,采用多重PCR方法,检测16S rRNA、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*和*see*基因。然而,多重PCR反应需要在扩增反应体系中加入2对以上引物,致使引物之间存在竞争关系,未经深度优化的MPCR检测方法,其检测结果往往不够稳定。

2.2.2 实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)具有快速、低成本、高通量、高特异性和敏感性等优点,可用于病原菌的常规检测。qPCR的2种主要类型是基于荧光探针的检测和基于荧光染料的检测^[24]。基于TaqMan探针的众多病原体平台是近几年发展起来的,LIU等^[25]研究建立了一种能同时检测和定量检测金黄色葡萄球菌等12种常见病原菌的TaqMan实时聚合酶链式反应方法。qPCR的主要优点是在分析过程中需要更少的时间,但其可能受到从食品基质中提取的DNA中存在的PCR抑制剂的影响,事实上,在分析过程中,DNA提取是第一步,高质量的DNA是确保后续qPCR的最重要因素。

2.2.3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种在单一温度($60\ ^\circ\text{C}\sim 65\ ^\circ\text{C}$)条件下快速、特异的DNA扩增方法。它不再受昂贵的热循环仪限制,更适合于临床诊断。LING等^[26]建

立了一种用 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 微球提取 DNA, 然后用 LAMP 检测金黄色葡萄球菌特异性 DNA 序列的方法, 可以检测到的浓度低至 10^2 CFU/mL。XIONG 等^[27]设计开发了第一个基于 pH 敏感指示剂的 LAMP 检测方法, 用于肉眼检测食源性金黄色葡萄球菌。首先, 针对不同金黄色葡萄球菌中 *gyrB* 基因的保守片段设计了两对内外引物; 其次, 在各种 pH 值和其他条件下对弱缓冲的 *gyrB*-LAMP 分析方法进行了优化, 再对 5 种 pH 敏感的指示剂进行了评估, 并选择甲酚红作为最佳染料, 以获得最佳视觉性能; 最后, 基于甲酚红的 LAMP 检测显示出良好的灵敏度, 对纯化的 DNA 的检测限为 5.4 CFU/mL, 并且具有良好的特异性, 与其他近源微生物无交叉反应。对 *Xba* I 限制性内切酶消化分析进一步证实了扩增产物的特异性。以甲酚红为基础的 LAMP 测定通过接种已知数量的金黄色葡萄球菌的临床干鱼样品进行了验证。但是 LAMP 在技术上仍存在一些难题, 如引物比较复杂, 可能会造成引物自联产生假阳性; 扩增产物的片段较大, 不易降解, 易造成环境污染等, 这些都是需要考虑的问题。

2.3 生物传感器检测技术

2.3.1 光学生物传感器

光学生物传感器已经成为检测生物活性物质的合适平台, 因其灵敏度高、反应速度快、方法简单而被开发出来^[28]。光学生物传感器可以分为反射法、吸收法、色散法、比色法、表面等离子体共振法、荧光法、磷光法和化学发光法。在这些方法中, 基于荧光和磷光检测的生物传感器因其高选择性和高灵敏度而备受关注, 十多年来被广泛用于化学、医学、生物学和药理学中对生物重要分子的选择性检测^[29]。CUI 等^[30]成功研制了一种检测金黄色葡萄球菌的量子点免疫荧光生物传感器, 该生物传感器结合了生物传感器的优点, 即抗原-抗体免疫相互作用的高度特异性和量子点荧光的高灵敏度和稳定性。结果表明, 该生物传感器对金黄色葡萄球菌的检测具有较高的特异性和灵敏度, 其检测限可达 1×10^4 CFU/mL。该方法需要电化学工作站具有昂贵的仪器和系列配套耗材, 对操作人员的技术要求也极高, 不适用于小规模检测。

2.3.2 电化学生物传感器

基于电化学的检测方法主要依赖于对传感器表面由于生物化学相互作用而发生的电流或电位变化的观察^[31]。根据观测到的电流、阻抗、电位和电导等参数, 将这些方法进一步分为安培法、阻抗法、电位法和电导法。电化学生物传感器的响应速度快、灵敏度高、操作简单, 是一种很有前途的现场快

速检测食源性致病菌的设备, 以保护食品供应链。

电化学 DNA 生物传感器在现场检测病原微生物方面具有独特的优势, 但针对基因组 DNA 分析的长 DNA 检测仍具有挑战性。XU 等^[32]制备了一种新型的电化学生物传感器, 利用多信号探针系统超灵敏地分析了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 基因组上的 *mecA* DNA。基于该概念验证传感器的电化学分析平台提供了便携式现场检测 MRSA 的巨大潜力。

3 展望

金黄色葡萄球菌是常见的食源性病原体, 在生鲜冷冻食品中容易被检出, 摄入此食品容易引发食物中毒, 因此, 在对金黄色葡萄球菌进行检测时, 应更加注重效率。金黄色葡萄球菌的快速检测技术众多, 但各有利弊。目前快速检测金黄色葡萄球菌的方法以免疫学检测技术和核酸检测技术较常见, 生物传感器技术为金黄色葡萄球菌的快速检测提供了技术参考。在实际检测过程中, 需要根据实际情况选择合适的检测方法, 或者是两种甚至多种检测方法的结合。金黄色葡萄球菌的快速检测技术正在日益更新, 从整体上看, 其正向快捷、高灵敏度、高特异性的方向发展。

参考文献

- [1] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. Sortases, surface proteins, and their roles in *Staphylococcus aureus* disease and vaccine development[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(1): 10.1128.
- [2] JENUL C, HORSWILL A R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(2): 10.1128.
- [3] GUERRA F E, BORGOGNA T R, PATEL D M, et al. Epic immune battles of history: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 286.
- [4] MILLER L S, FOWLER V G, SHUKLA S K, et al. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 44(1): 123-153.
- [5] BALASUBRAMANIAN D, HARPER L, SHOPSIN B, et al. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments [J]. *Pathogens and Disease*, 2017, 75(1): ftx005.
- [6] LAKHUNDI S, ZHANG K Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00020-e00018.
- [7] DI DOMENICO E G, CAVALLO I, CAPITANIO B, et al. *Staphylococcus aureus* and the cutaneous microbiota biofilms in the pathogenesis of atopic dermatitis [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 301.
- [8] MAIRI A, TOUATI A, LAVIGNE J P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 clone: A systematic review [J]. *Toxins*,

- 2020, 12(2): 119.
- [9] KANE T L, CAROTHERS K E, LEE S W. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics[J]. *Current Drug Targets*, 2018, 19(2): 111-127.
- [10] TAM K, TORRES V J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(2): 10.1128/microbiolspec.GPP3-10.1128/microbiolspec.0039-2018.
- [11] ORLIN I, ROKNEY A, ONN A, et al. Hospital clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are carried by medical students even before healthcare exposure [J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2017, 6: 15.
- [12] MACORI G, BELLIO A, BIANCHI D M, et al. Genome-wide profiling of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains used for the production of naturally contaminated cheeses[J]. *Genes*, 2019, 11(1): 33.
- [13] GUO Y L, SONG G H, SUN M L, et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 107.
- [14] KIM Y S, LEE S H, KIM S H, et al. Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea[J]. *Food Control*, 2015, 47: 226-230.
- [15] 曲彩红. 食源性致病菌带菌情况检测结果分析[J]. *临床研究*, 2021, 29(9): 137-139.
- QU C H. Detection results of food borne pathogens were analyzed[J]. *Clinical Research*, 2021, 29(9): 137-139.
- [16] GUTIÉRREZ D, RODRÍGUEZ-RUBIO L, GARCÍA P, et al. Phage sensitivity and prophage carriage in *Staphylococcus aureus* isolated from foods in Spain and New Zealand[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 230: 16-20.
- [17] ZHANG Y, TAN W Q, ZHANG Y, et al. Ultrasensitive and selective detection of *Staphylococcus aureus* using a novel IgY-based colorimetric platform [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 142: 111570.
- [18] 吴任之, 胡欣洁, 韩国全, 等. 食源性金黄色葡萄球菌快速检测方法的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(10): 291-296.
- WU R Z, HU X J, HAN G Q, et al. Research progress on rapid detection of food-borne *Staphylococcus aureus* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(10): 291-296.
- [19] WOOD J B, JONES L S, SOPER N R, et al. Serologic detection of antibodies targeting the leukocidin LukAB strongly predicts *Staphylococcus aureus* in children with invasive infection [J]. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2019, 8(2): 128-135.
- [20] KIM M H, RHO M, CHOI J P, et al. A metagenomic analysis provides a culture-independent pathogen detection for atopic dermatitis [J]. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2017, 9(5): 453-461.
- [21] NAGASAWA Y, KIKU Y, SUGAWARA K, et al. Rapid *Staphylococcus aureus* detection from clinical mastitis milk by colloidal gold nanoparticle-based immunochromatographic strips [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 6: 504.
- [22] TAO J, LIU W W, DING W, et al. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 744-754.
- [23] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 食品中金黄色葡萄球菌多重PCR检测方法的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(1): 84-89.
- XU X K, WU Q P, ZHANG J M, et al. Studies on detection of staphylococcus aureus in foods by multiplex PCR [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(1): 84-89.
- [24] HU L Y, HAN B, TONG Q, et al. Detection of eight respiratory bacterial pathogens based on multiplex real-time PCR with fluorescence melting curve analysis [J]. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020, 2020: 2697230.
- [25] LIU Y, CAO Y, WANG T, et al. Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction conditions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 222.
- [26] LING Y Z, ZHU Y F, FAN H H, et al. Rapid method for detection of *Staphylococcus aureus* in feces [J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2019, 15(6): 1290-1298.
- [27] XIONG J, HUANG B, XU J S, et al. A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(1): 201-211.
- [28] DAMBORSKÝ P, ŠVITEL J, KATRLÍK J. Optical biosensors [J]. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60(1): 91-100.
- [29] YANG Q, LI J H, WANG X Y, et al. Strategies of molecular imprinting-based fluorescence sensors for chemical and biological analysis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 112: 54-71.
- [30] CUI J W, ZHOU M J, LI Y, et al. A new optical fiber probe-based quantum dots immunofluorescence biosensors in the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 665241.
- [31] RUBAB M, SHAHBAZ H M, OLAIMAT A N, et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 105: 49-57.
- [32] XU L, LIANG W, WEN Y L, et al. An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 424-430.