

coccus aureus[J]. *Emerging Infectious Disease*, 2002, 8(1): 82-84.

[7] 贺文强, 陈宏斌, 赵春江, 等. 2010—2011年中国10个主要城市金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2013, 33(4): 247-251.

[8] 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.

[9] 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*, 2004, 16(1): 35-37.

论著

上海市闵行区初级农产品中金黄色葡萄球菌污染状况及毒力基因分布特征研究

骆玲飞, 王小光, 刘继倩, 宋驰萍, 乔坤, 欧阳霖, 陈秀华, 刘芸

(上海市闵行区疾病预防控制中心, 上海 201101)

摘要:目的 了解上海市闵行区初级农产品中金黄色葡萄球菌的污染状况及毒力基因的携带情况。方法 按国标方法, 采用科玛嘉显色培养基, 对初级农产品中的金黄色葡萄球菌进行分离、生化鉴定, 收集的菌株采用实时荧光PCR方法检测血浆凝固酶基因 *coa*, 耐热核酸酶基因 *nuc*, 粘附素基因 *clfA* 和肠毒素基因 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*。结果 206份食品中检出金黄色葡萄球菌43株, 检出率为20.87%; 43株金黄色葡萄球菌均含有 *coa*、*nuc* 和 *clfA* 基因, 而 *see* 基因全部缺失, 其余4个毒力基因则表现为部分缺失。结论 本地区初级农产品中存在金黄色葡萄球菌的污染, 生肉禽类食品中金黄色葡萄球菌污染比较严重, 应加强监督管理; 金黄色葡萄球菌菌株均包含有 *coa* 毒力基因, 可以作为一项检测其致病力的指标。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 污染; 毒力基因; 食源性致病菌; 初级农产品; 农产品; 食品安全

中图分类号: R155.5; R378.11 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0434-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.05.006

The contamination of *Staphylococcus aureus* and the distribution of virulence genes in the primary farm products of Minhang District, Shanghai

LUO Ling-fei, WANG Xiao-guang, LIU Ji-qian, SONG Chi-ping, QIAO Kun, OU Yang-lin, CHEN Xiu-hua, LIU Yun

(Center for Disease Control and Prevention, Minhang District, Shanghai 201101, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination and the virulence genes of *Staphylococcus aureus* in the primary farm products of Minhang District, Shanghai. **Methods** CHROMagar color medium and API *S. aureus* were used for separation and biochemical identification of *S. aureus* according to national standard. Virulence genes of *coa*, *nuc*, *clfA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* were detected by real-time PCR methods. **Results** 43 isolates were identified from 206 *S. aureus* samples, and the detection rate was 20.87%. All the identified strains had *coa*, *nuc* and *clfA* virulence genes, but no *see* virulence gene was found, and the remaining four virulence genes expressions were partially missing. **Conclusion** The contamination of *S. aureus* in the primary farm products existed in Minhang district of Shanghai. Supervision and management should be strengthened for raw meat and poultry for serious contamination. All *S. aureus* strains contained *coa* virulence gene. It could be used as a target for detecting virulence genes.

Key words: *Staphylococcus aureus*; contamination; virulence genes; foodborne pathogenic bacteria; primary farm products; farm products; food safety

金黄色葡萄球菌在自然界中广泛存在, 可以引起

各种化脓性炎症和食物中毒, 是食源性疾病的重要病原菌之一。据报道^[1], 2006年在美国由于金黄色葡萄球菌引起的食物中毒有29起, 在细菌性食物中毒中居第三位。我国每年发生的此类食物中毒事件也非常多, 全国各地均有报道^[2-3]。金黄色葡萄球菌的致病原理与其很多毒力基因有关。其中, 最重要的一种就是肠毒素(SE)基因。常见的肠毒素分为5种,

收稿日期: 2014-04-26

基金项目: 上海市闵行区科委自然科学基金项目(2011MHZ55)

作者简介: 骆玲飞 女 主管技师 研究方向为病原微生物

E-mail: anita2007@sina.cn

通讯作者: 王小光 男 主任技师 研究方向为病原微生物

E-mail: wxg2479038@sina.com

分别是 *sea*、*seb*、*sec*、*sed* 和 *see*^[4]。为了解本地区食品中金黄色葡萄球菌的污染状况和其毒力基因携带情况,本文对 206 份初级农产品进行金黄色葡萄球菌检测,同时对金黄色葡萄球菌的 8 个相关毒力基因进行了检测,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及标准菌株

上海市闵行区域内随机抽取一集贸市场采集初级农产品共 206 份。其中畜类肉 60 份,禽类肉 50 份,蔬菜类 95 份。

金黄色葡萄球菌(CICC 21600),由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪(美国 Eppendorf)。金黄色葡萄球

菌显色平板(上海科玛嘉生物技术有限公司)、API 生化试条(法国生物梅里埃)。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离及鉴定

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》^[5]对样品采用 TSB 预增菌后,分别接种于 Baird-Parker 显色培养基进行金黄色葡萄球菌初筛分离;对收集的可疑菌株接种 API 生化试条,36 ℃ 培养 18~24 h,进行生化鉴定;同时做血浆凝固酶试验。

1.2.2 引物序列

8 种毒力基因 *coa*、*pvl*、*nuc*、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* 根据 GenBank 公布的序列,应用 ABI 公司 primerexpress 3.0 软件设计引物和探针(由江苏硕世生物科技有限公司提供),见表 1。

表 1 8 种毒力基因引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequence of virulence genes

毒力基因	GenBank 号	引物及探针	核苷酸序列(5'-3')	产物大小/bp
血浆凝固酶 (<i>coa</i>)	AB436988.1	<i>coa</i> -F	TTGGGCAATTACATTTTGGAG	146
		<i>coa</i> -R	ACTATCGCATCTGCTTTGTTATC	
		<i>coa</i> -P	FAM-TGCGCCTAGCGAAATTATTTGC-BHQ1	
粘附素 (<i>clfA</i>)	JQ278703.1	<i>clfA</i> -F	ATGTGACAGTTGGTATTGACTCTGG	115
		<i>clfA</i> -R	TAGGCACTGAAAAACCATAATTCAGT	
		<i>clfA</i> -P	FAM-CGACTGTGTATCCGCACCAAGCAGG-BHQ1	
耐热核酸酶 (<i>nuc</i>)	EF571830.1	<i>nuc</i> -F	GGTTGATACACCTGAAACAAAGC	119
		<i>nuc</i> -R	CCTTTGTCAAACCTCGACTTCAAT	
		<i>nuc</i> -P	FAM-CACTTGTCTCAGGACCATATTTCTCTACAC-BHQ1	
肠毒素 a (<i>sea</i>)	EF520720.1	<i>sea</i> -F	TGGAAACGGTTAAAAACGAATAAG	151
		<i>sea</i> -R	TCCTGTAAATAACGCTTGTGCTTG	
		<i>sea</i> -P	FAM-CTGTTTCAGGAGTTGGATC-BHQ1	
肠毒素 b (<i>seb</i>)	AY852244.1	<i>seb</i> -F	TGTATGTATGGAGGTGTAACGTT	115
		<i>seb</i> -R	CCGTTTCCAAAGGTAAGTATT	
		<i>seb</i> -P	FAM-ACCGTCTAGCCATAAATTGATCGGCA-BHQ1	
肠毒素 c (<i>sec</i>)	GQ461752.1	<i>sec</i> -F	ACCAGACCCTAYGCCAGATGAGT	135
		<i>sec</i> -R	GTGCCAAAAATTTATCTACAGAC	
		<i>sec</i> -P	FAM-TCAAGTGAGTTACTGCTACGATGGGT-BHQ1	
肠毒素 d (<i>sed</i>)	M94872.1	<i>sed</i> -F	GTTTGTAATATCTCCTTTAAACGT	134
		<i>sed</i> -R	TGGATTTTTATCTGCATAAGAATGT	
		<i>sed</i> -P	FAM-TTATTTAGCGCGGTACTACTTAATTCAGAT-BHQ1	
肠毒素 e (<i>see</i>)	AY518387.1	<i>see</i> -F	AGAAGTAACTGTTCAAGAGCTAGAT	126
		<i>see</i> -R	CAAAGCTGTCTGAGTTATATAAACCC	
		<i>see</i> -P	FAM-TCAGGCAAGGCATTATTTACACGGAA-BHQ1	

1.2.3 毒力基因检测

将收集的菌株分别接种于血琼脂平板,36 ℃ 过夜培养,挑取适量纯菌到 100.0 μl 无菌去离子水中,振荡混匀,用于 PCR 扩增。PCR 反应体积为 20.0 μl,其中 10 × bufer 2.0 μl,5 × 10⁴ μmol/L MgCl₂ 1.2 μl,1 × 10⁴ μmol/L dNTPs 0.5 μl,4 U/μl *Taq* 酶 0.3 μl,10 μmol/L 引物各 0.8 μl,10 μmol/L 探针 0.4 μl,DNA 模板 2.0 μl,去离子水 12.0 μl。PCR 扩增反应

条件:95 ℃ 5 min 预变性,95 ℃ 10 s 变性,55~60 ℃ 45 s 退火/延伸及荧光检测,40 个循环。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌污染情况

206 件包括生畜肉类,生禽肉类,生蔬菜类 3 种初级农产品中共检出金黄色葡萄球菌 43 株,检出率为 20.87% (43/206),见表 2。

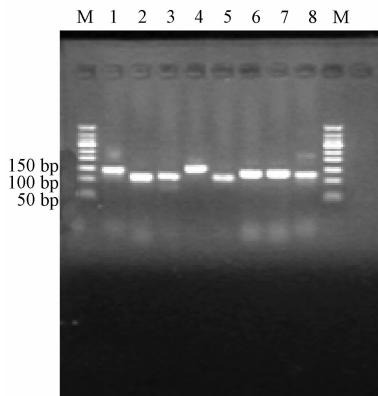
表2 3种初级农产品中金黄色葡萄球菌的检出情况

Table 2 Detection of *Staphylococcus aureus* in 3 kinds foods

目标菌	检出率/%		
	生畜肉类 (60份)	生禽肉类 (50份)	生蔬菜类 (96份)
金黄色葡萄球菌	31.67(19/60)	26.00(13/50)	11.46(11/96)

2.2 毒力基因携带情况

43株金黄色葡萄球菌 *coa*、*nuc*、*clfA*、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* 8种毒力基因携带率分别为 100.00%、100.00%、100.00%、23.26%、6.98%、9.30%、13.95%、0%；其中有3株同时含有 *sea* 和 *seb* 基因，2株同时含有 *sec* 和 *sed* 基因，见图1、2和表3。



注：M：Marker；1. *nuc* 基因；2. *coa* 基因；3. *dfa* 基因；

4. *sea* 基因；5. *seb* 基因；6. *sec* 基因；7. *sed* 基因；8. *see* 基因

图1 8种毒力基因扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoregram of 8 virulence genes

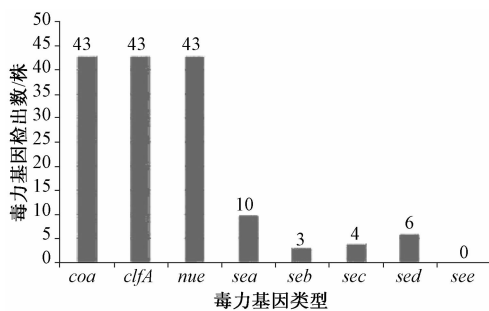


图2 8种毒力基因检出结果

Figure 2 Results distribution of virulence genes

2.3 血浆凝固酶试验结果

43株金黄色葡萄球菌均为阳性。

3 讨论

本次调查发现,上海市闵行区集贸市场初级农产品中存在金黄色葡萄球菌的污染。动物源性食品(肉类)污染比较严重,生畜肉类和禽肉类总污染率为29.09%(32/110),生蔬菜类为11.46%(11/96)。

43株金黄色葡萄球菌8种毒力基因的检测发现,全部菌株均包含有血浆凝固酶基因 *coa*、耐热核酸酶基因 *nuc*、粘附素基因 *clfA*,与相关报道^[6]一致;

表3 5种肠毒素基因分布结果

Table 3 Result distribution of enterotoxin genes

菌种序号	来源	肠毒素基因				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
SA2	3	+	-	-	-	-
SA6	1	+	-	-	-	-
SA7	1	+	+	-	-	-
SA8	2	-	-	+	-	-
SA9	1	+	-	-	-	-
SA10	1	+	-	-	-	-
SA12	1	-	-	-	+	-
SA16	2	+	+	-	-	-
SA19	3	-	-	-	+	-
SA20	1	+	-	-	-	-
SA23	2	+	-	-	-	-
SA26	1	-	-	+	+	-
SA27	3	-	-	-	+	-
SA28	2	-	-	+	-	-
SA32	1	+	-	-	-	-
SA36	2	+	+	-	-	-
SA39	2	-	-	-	+	-
SA42	1	-	-	+	+	-

注:43株金黄色葡萄球菌编号从SA1到SA43;1为生畜肉类,2为生禽肉类,3为生蔬菜类;+为检出毒力基因,-为未检出毒力基因

5种肠毒素基因,*sea*、*seb*、*sec*、*sed*分别为23.26%、6.98%、9.30%、13.95%,*see*基因则表现为缺失,与一些报道结果^[7-8]相符合。

43株金黄色葡萄球菌中,有18株含有5种肠毒素,占41.86%,高于有关报道^[2];另有13株只检出1种肠毒素基因;5株检出2种肠毒素基因,即3株*sea*+*seb*,2株*sec*+*sed*,且均检自动物源性食品(肉类)。动物源性食品中金黄色葡萄球菌肠毒素的携带率为46.87%(15/32),明显高于蔬菜类的27.27%(3/11)。研究表明,食物中毒中最常见的是*sea*、*sed*型,其次为*seb*、*sec*型,而*see*型肠毒素的发生率则最低,这也与各型肠毒素毒力有关,a型毒素毒力较强,d型较弱^[9]。本地区金黄色葡萄球菌肠毒素的携带情况与上述相符,以*sea*基因的检出率最高,也再次说明肠毒素*sea*在由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒中的重要地位。

coa、*nuc*和*clfA*3个与致病力密切相关的毒力基因在206件初级农产品的检出率为100%,以及金黄色葡萄球菌在食源性疾病中名列前茅的检出率提示,食品安全监督部门应从源头上抓起。特别是肠毒素是一种低分子量蛋白及多肽,热稳定性高,70~80℃下,30min内不能被完全破坏,且不会被胰蛋白酶所降解。提示在加工处理食品时,特别是动物源性食品,要充分加热,防止由于加工环节疏忽而引起此类食物中毒事件的发生。

43株金黄色葡萄球菌均检出血浆凝固酶毒力基因*coa*,与血浆凝固酶试验的结果一致。血浆凝

固酶的存在是间接表明菌株具有致病力的一项重要判断指标,而血浆凝固酶毒力基因 *coa* 的存在,则从分子基因水平上确认了菌株的致病力。因此提示,可以把实时荧光 PCR 这个高度灵敏、特异、快速的检测方法,运用到金黄色葡萄球菌的检测工作中,以代替金黄色葡萄球菌血浆凝固酶这个传统试验,使之作为其致病力的一项重要检测指标。

参考文献

- [1] U. S. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease outbreaks—United States, 2006 [EB/OL]. [2009-08-01]. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5822a1.htm>.
- [2] 任艳芳,路燕,庞晶晶,等.一起由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒[J].首都公共卫生,2011,5(2):90-91.
- [3] 吴剑阁,刘英豪,楼萍,等.一起由金黄色葡萄球菌肠毒素引起群体性食物中毒的病原学分析[J].现代预防医学,2011,

- 38(8):1424-1425.
- [4] Capucine L, Sylvie P, Francoise D, et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the *Staphylococcus enterotoxigenes* sea to sej [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17(4) : 139-147.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 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]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] 陈智,江元山,熊燕,等.金黄色葡萄球菌食物中毒分离株毒素基因的 PCR 分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1) : 21-23.
- [7] 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型分布研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5) : 427-429.
- [8] 葛小萍,陈棋炯,孙永祥,等.应用实时荧光 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素基因 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9) : 2099-2101.
- [9] Lawrynowicz P M, Kochman M, Piekarska K, et al. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 117(3) : 319-323.

研究报告

甘肃省市售浆水中亚硝酸盐含量测定

郑洁,胡向轩,张莉,张培,刘晔玮

(兰州大学公共卫生学院营养与食品卫生研究所,甘肃兰州 730000)

摘要:目的 了解甘肃省市售浆水中亚硝酸盐的含量。方法 对 GB 5009.33—2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》方法做了改进,省略了沉淀蛋白质的步骤;并按照改进的方法测定了采集于 2013 年 4 月至 8 月的 62 份浆水样品中亚硝酸盐的含量。结果 62 份样品中亚硝酸盐含量均低于 2 mg/kg,平均亚硝酸盐含量为 0.64 mg/kg;含菜浆水亚硝酸盐含量高于不含菜浆水。结论 依据 GB 2762—2012《食品中污染物限量》中规定的蔬菜及其制品、腌渍发酵蔬菜中亚硝酸盐最大量为 20 mg/kg,62 份样品中亚硝酸盐含量均未超标。

关键词:市售浆水;亚硝酸盐;甘肃;食品污染物

中图分类号:R155;O611.65 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0437-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.007

Nitrite content and safety evaluation of Jiangshui purchased from markets in Gansu

ZHENG Jie, HU Xiang-Xuan, ZHANG Li, ZHANG Pei, LIU Ye-wei

(Institute of Nutrition and Food Hygiene, of Public Health, Lanzhou University, Gansu Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the nitrite content of Jiangshui purchased from markets in Gansu. **Methods** Improvements had been made to the GB 5009.33-2010 method for determination of nitrite and nitrate in food, and the protein precipitation step was skipped. 62 samples, collected from April to August 2013, were detected using the modified method of GB 5009.33-2010. **Results** Nitrite contents of 62 samples were lower than 2 mg/kg, and the average content was 0.64 mg/kg. Nitrite content of Jiangshui containing vegetables were higher than those not. **Conclusion** On the basis

收稿日期:2014-03-24

基金项目:兰州市科技发展计划项目(2010-1-164)

作者简介:郑洁 女 研究生 研究方向为食品安全分析及评价 E-mail:zhengj12@lzu.cn

通讯作者:刘晔玮 女 副教授 研究方向为食品安全分析及评价 E-mail:liuyw@lzu.edu.cn