

· 广东省重点出版物 ·



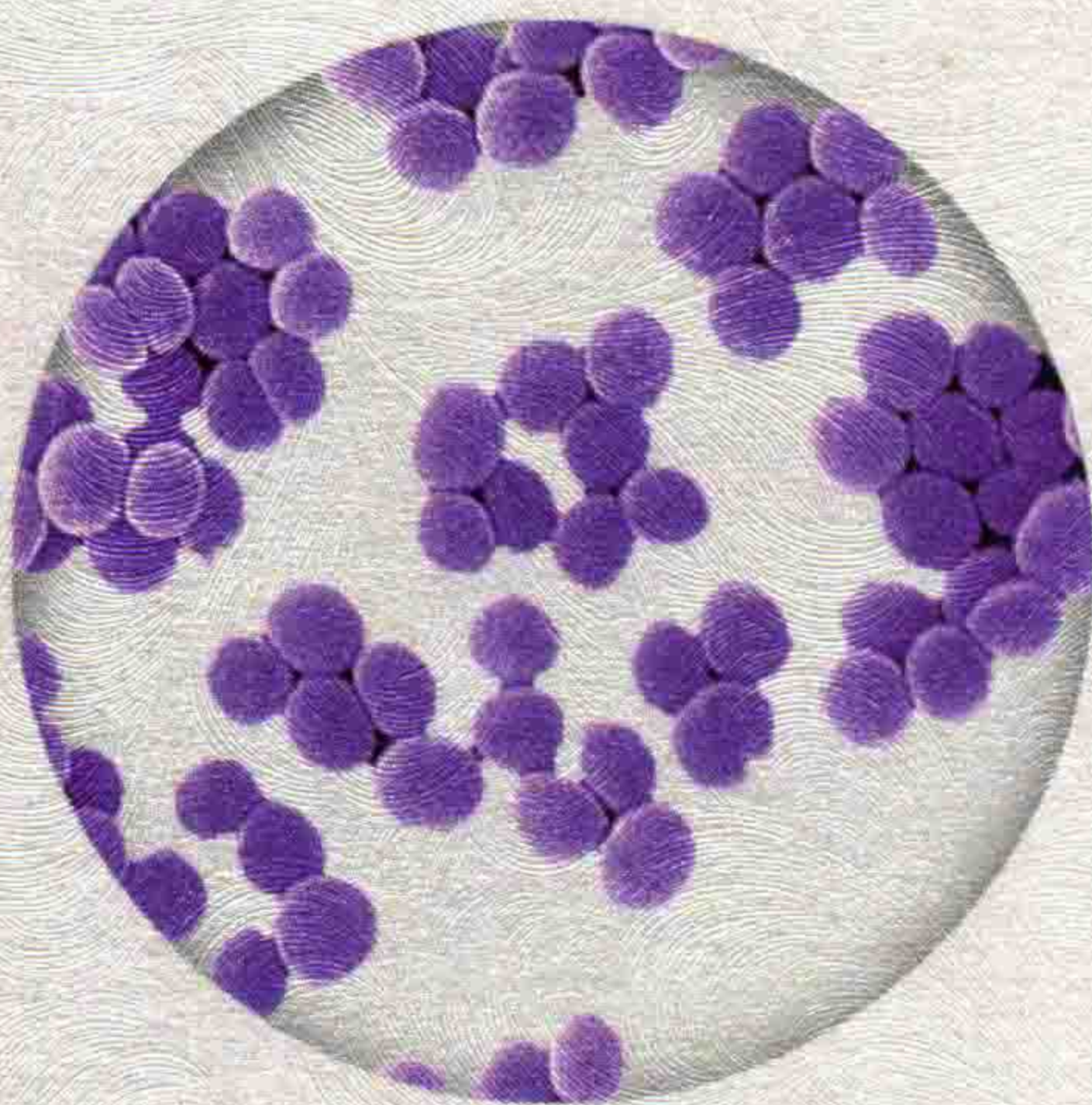
学术前沿研究文库

Library for the Frontier of Academic Research

葡萄球菌生物被膜的 分子机制研究

Study on the Molecular Mechanism of Staphylococcal Biofilms

徐振波 © 著



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广东省重点出版物 ·



学术前沿研究文库
Library for the Frontier of Academic Research

葡萄球菌生物被膜的 分子机制研究

Study on the Molecular Mechanism of Staphylococcal Biofilms

徐振波 © 著



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广州 ·

图书在版编目(CIP)数据

葡萄球菌生物被膜的分子机制研究/徐振波著. —广州:华南理工大学出版社, 2018.6

(学术前沿研究文库)

ISBN 978-7-5623-5407-9

I. ①葡… II. ①徐… III. ①葡萄球菌-包膜-分子机制-研究 IV. ①Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 300931 号

葡萄球菌生物被膜的分子机制研究

徐振波 著

出版人: 卢家明

出版发行: 华南理工大学出版社

(广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

<http://www.scutpress.com.cn> E-mail: scutcl3@scut.edu.cn

营销部电话: 020-87113487 87111048 (传真)

策划编辑: 袁 泽

责任编辑: 王荷英 袁 泽

印刷者: 广州星河印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 15 字数: 327 千

版 次: 2018 年 6 月第 1 版 2018 年 6 月第 1 次印刷

定 价: 68.00 元

版权所有 盗版必究 印装差错 负责调换

学术前沿研究文库

编审委员会

名誉主任：王迎军 曹 镛

主任：朱 敏

委员（以姓氏拼音排序）：

安 然	陈春花	陈克复	陈少伟	程榕时	扶 雄
管 霖	管少平	韩国强	何镜堂	黄培彦	季 飞
姜中宏	李 东	李继承	李立涅	李远清	廉哲雄
梁 军	林章凇	刘焕彬	刘社欣	刘正荣	刘正猷
卢家明	吕发创	孟庆林	裴海龙	彭俊彪	钱 宇
瞿金平	苏 成	苏宏元	孙一民	唐本忠	王 聪
王仁曾	王振宇	吴 波	吴克昌	吴青华	吴硕贤
吴振强	肖毅强	解丽霞	徐松林	徐向民	薛 泉
杨中民	叶代启	曾新安	张 军	张 平	张卫国
张宪民	张正国	章秀银	赵谋明	钟书能	朱长江
朱能武					

前 言

食品工业是关系国计民生的生命产业，也是一个国家经济发展水平和人民生活质量的重要标志，而其中，食品安全问题越来越引起国家和社会的关注。在食品安全领域的众多问题中，食源性疾病的发病率居各类疾病总发病率的前列，成为最突出的卫生问题之一。由微生物引起的安全问题，成为多种食源性疾病的主因，其范畴和影响都是一个不断扩大的全球性公共卫生问题。传统的食品微生物安全问题集中于由致病微生物引起的细菌性食物中毒，但随着对食品安全认识的加深和范畴的扩展，由于抗生素在动物食品中的滥用而引起食源性微生物的耐药性，以及微生物通过改变生长方式形成生物被膜从而逃逸常规灭菌消毒处理造成食品污染等，均属于重要的食品微生物安全问题。

本书基于食品工业领域中的微生物安全问题，以食源致病性微生物葡萄球菌为对象，研究其流行状况（包括毒素及耐药基因分布），对菌种进行检测和鉴定，并开发建立新型快速鉴定方法。通过研究葡萄球菌的基因组岛和整合子系统，分析其耐药分子机制及其与表型的相关性，考察葡萄球菌生物被膜黏附与脱落的基因调控行为，从而前瞻性地提出消除由葡萄球菌在食品加工及糖加工领域引起的安全隐患的可能方法。主要研究内容和结果如下：

（1）建立一种能同时对葡萄球菌及甲氧西林耐药因子 *mecA* 进行检测与鉴定的多重 PCR 体系；同时应用该方法于 262 株葡萄球菌，对其进行金葡菌鉴定及甲氧西林耐药因子的检测。结果表明，262 株葡萄球菌包括 209 株金葡菌和 53 株凝固酶阴性葡萄球菌，均为甲氧西林耐药，检出率达 100%。而对 262 株葡萄球菌进行常见 4 种毒素基因的检测，结果显示，262 株葡萄球菌均不携带 4 种毒素基因。可见，目前流行的葡

萄球菌以耐药性为显著的特点,而致毒性则不常见。

(2) 基于 LAMP 快速检测技术,建立针对葡萄球菌及其关键耐药因子的快速检测体系,为进一步对葡萄球菌进行全面性监控提供技术方法的支持。针对葡萄球菌属 16S rRNA、*femA* 和 *mecA* 基因分别设计 LAMP 引物,建立和优化了环介导恒温核酸扩增体系,成功实现对 MRSA、MSSA、MRCNS 和 MSCNS 的快速检测。通过检测 41 株对照菌株验证 LAMP 反应的高特异性,同时反应最低检出限可达 10 CFU/reaction 细菌量和 100 fg 模板 DNA,比 PCR 反应灵敏度高 10 ~ 1000 倍;LAMP 反应快速、耗时少,从模板 DNA 提取至结果判断,仅需 60 ~ 80 min;反应过程简便稳定,对模板 DNA 的要求较低,采用粗提方法即可;不需要精密的温度循环装置,普通水浴锅或其他有稳定热源的装置即可实现,使反应更简便;反应实用性强,应用于 118 株葡萄球菌的检测,16S rRNA、*femA* 和 *mecA* 基因灵敏度分别达 100%、98.5% 和 92.3%。

(3) 通过对葡萄球菌耐药表型和分子机理的研究,包括传统基因组岛 SCC*mec* 和新型整合子系统,为了解及追踪潜在“超级细菌”之一的葡萄球菌耐药性的发展和进化提供科学依据,对 262 株葡萄球菌的耐药表型以及基因组岛和整合子系统两种耐药分子机制进行了研究与分析。262 株葡萄球菌中多重耐药性占 82.1% (215/262),其中 9、27 和 211 株分别携带 I、II 和 III 型基因组岛 SCC*mec*,另有 15 株无法分型;262 株葡萄球菌中 122 株携带第一类整合子,包括 4 种不同的耐药基因盒。在传统基因组岛 SCC*mec* 和新型整合子系统等耐药机制作用下,耐药性成为葡萄球菌最显著的特征,多重耐药性进一步增强,严重威胁未来人类的生存。

(4) 为了解葡萄球菌的传播渠道与侵袭途径、基因来源与克隆起源,以及基因组进化与流行变迁,对葡萄球菌进行指纹图谱分析并且深入地解析其基因组背景。通过对 29 株 MRSA 进行指纹图谱及遗传相似性分析,结果显示葡萄球菌可能的侵袭途径包括通过空气和接触进行人与人之间的传播或通过繁殖于各种表面进行人与环境之间的传播;通过

对 209 株 MRSA 和 23 株 MRCNS 进行指纹图谱分析,结果显示整合子在 MRCNS 中为多克隆来源,以耐药基因的横向水平转移为主,在 MRSA 中则多为寡克隆来源,但同时存在耐药基因的横向水平转移和纵向垂直传播;对 46 株 MRSA 进行多位点序列分型,对 22 株 MRSA 进行表面蛋白 A 基因和凝固酶基因分型,结果显示目前流行的金葡菌与中国台湾、香港地区以及除日本和韩国外的大多数亚洲国家(包括新加坡、印尼、泰国等)的多个地区流行的菌株基因组背景相同,该流行菌株在巴西、葡萄牙和维也纳等国家和地区也是主要的流行类型,其进化与迁移途径有待进一步研究。

(5) 对 257 株金葡菌生物被膜形成总量进行结晶紫染色法定量检测,其中 75.1% (193/257)、22.6% (58/257) 与 2.3% (6/257) 的菌株分别可形成少量、中等量与大量生物被膜。对其代谢活性进行 XTT 染色法定量检测,其中 77.0% (198/257)、17.9% (46/257) 与 5.1% (13/257) 的菌株生物被膜代谢活性分别为一般、中等以及强。其中,57.2% (167/257) 的菌株形成的生物被膜的代谢活性和形成总量处于同一水平,两种方法的相关性为 65%。进一步结合金葡菌基因组背景显示,携带 II 型 SCC_{mec} 的菌株其生物被膜形成能力较其他型别强。

(6) 对 262 株金葡菌生物被膜相关基因进行研究发现,初始黏附阶段附着基因 *atl* 携带率高达 98.1%,而 *icaA*、*icaD* 和 *icaBC* 基因携带率分别为 90.1%、93.1% 和 94.7%,其中 81.7% 的菌株同时携带 *icaA*、*icaD* 和 *icaBC*,说明多数金葡菌在生物被膜形成过程中具备可合成并分泌 PIA 的能力。成熟阶段聚集效应基因 *aap* 携带率为 87.0%,而分化调控基因 *agr* 携带率则为 84.4%。结果显示,金葡菌在生物被膜形成过程中具有初始黏附、细胞间粘连和聚集能力。

(7) 对 9 株金葡菌生物被膜形成情况进行研究发现,在 0~14 d,被膜形成总量不断增加,最后趋于不变,而在 0~16 h,生物被膜代谢活性逐渐升高,24 h 之后均开始逐渐降低,至 7~14 d 趋于稳定不变状态。说明金葡菌生物被膜的黏附期为 0~8 h,发展期为 16~48 h,成

熟及分化期为 3 ~ 14 d。结合菌株基因型与表型发现, *atl* 基因在生物被膜黏附初期发挥重要作用, *ica* 基因和 *aap* 基因在生物被膜形成发展中期、成熟期发挥重要作用, *agr* 基因在生物被膜脱落分化期发挥一定作用, 同时生物被膜的形成受多种基因和因素共同影响。最适宜金葡萄菌生物被膜形成的是温度为 37℃、pH 为 7 左右的中性环境, 低于 100% 的 TSB 配比会抑制金葡萄菌生物被膜的形成, 低浓度葡萄糖与高浓度盐会促进金葡萄菌生物被膜的形成。

(8) 对于不同成熟度以及不同生物被膜形成能力的菌株, 在热加工条件下对金葡萄菌生物被膜中 CML 生成规律进行研究发现, CML 生成量随生物被膜培养时间的延长而增加, 在被膜形成早期 (0 ~ 24 h) 增长较慢, 在被膜形成中期 (24 ~ 48h) 增长较快; 同时, 具有不同生物被膜形成能力的菌株中, CML 生成量存在差异。结果表明, 食源性致病菌生物被膜在热加工条件下能生成潜在化学危害物 CML, 其生成量受被膜成熟度和菌株的被膜形成能力所影响。

编 者

2017 年 9 月

目 录

1	食品中的微生物安全	1
1.1	食品安全概述	1
1.2	葡萄球菌食物中毒及其流行病学特点	2
1.2.1	葡萄球菌细菌性食物中毒	2
1.2.2	葡萄球菌的流行病学特性	3
1.3	葡萄球菌的致毒性	5
1.3.1	葡萄球菌肠毒素	5
1.3.2	杀白细胞毒素	13
1.3.3	表皮剥脱毒素	13
1.3.4	中毒休克综合征毒素	14
1.3.5	其他毒素	14
1.4	葡萄球菌的耐药性	14
1.4.1	葡萄球菌耐药现状	14
1.4.2	葡萄球菌耐药机制	15
1.5	葡萄球菌生物被膜	15
1.5.1	生物被膜概述	16
1.5.2	葡萄球菌生物被膜概述	17
1.5.3	生物被膜与食品安全	20
2	葡萄球菌的鉴定与快速检测	21
2.1	常规 PCR 技术	21
2.2	多重 PCR 技术	22
2.3	PCR 方法扩增葡萄球菌相关基因	23
2.3.1	实验菌株	23
2.3.2	实验方法	23
2.3.3	检测结果分析	27
3	葡萄球菌肠毒素	33
3.1	葡萄球菌肠毒素的生物学性状	33
3.1.1	SEs 的分型	33

3.1.2	SEs 的结构	33
3.1.3	SEs 的理化性质	34
3.1.4	SEs 的超抗原作用	34
3.1.5	影响 SEs 产生的因素	34
3.1.6	金黄色葡萄球菌与 SEs 的关系	34
3.2	SEs 的病理学特性	35
3.2.1	SEs 的致病性	35
3.2.2	SEs 中毒的临床表现	36
3.2.3	SEs 的预防、诊断与治疗	36
3.3	SEs 的应用	36
3.4	SEs 的检测	37
3.4.1	动物实验法	37
3.4.1	免疫血清学方法	37
3.4.3	微生物仪器检测法	37
3.4.4	核酸扩增方法	38
4	葡萄球菌的耐药性研究	48
4.1	葡萄球菌的耐药表型	48
4.1.1	葡萄球菌的来源分布及耐药率趋势	49
4.1.2	MRSA 研究进展	51
4.1.3	万古霉素耐药葡萄球菌研究进展	56
4.2	基因组岛 SCCmec	59
4.2.1	SCCmec 的结构	60
4.2.2	SCCmec 的类型	61
4.2.3	SCCmec 的分布	62
4.2.4	SCCmec 的进化	63
4.2.5	SCCmec 的检测与鉴定	64
4.3	葡萄球菌耐药机制的进化和发展	73
5	葡萄球菌的指纹图谱分析与基因组背景分析	75
5.1	葡萄球菌传播渠道和侵袭途径的研究	75
5.1.1	23 株 MRSA 菌株的指纹图谱及基因相似性分析	75
5.1.2	6 株 MRSA 菌株的指纹图谱分析	78
5.2	葡萄球菌基因来源与克隆起源的研究	80
5.2.1	23 株携带基因盒 <i>dfrA12-orfF-aadA2</i> 的 MRCNS 菌株的指纹图谱及基因相似性分析	80

5.2.2	30 株 MRSA 菌株的指纹图谱及基因相似性分析	81
5.2.3	179 株 MRSA 菌株的指纹图谱及基因相似性分析	82
5.3	葡萄球菌基因组进化与流行变迁的研究	84
5.3.1	MRSA 菌株的多位点序列分型	84
5.3.2	MRSA 菌株的表面蛋白 A 基因分型	89
5.3.3	MRSA 菌株的凝固酶基因分型	92
5.3.4	葡萄球菌基因组背景分析与国际流行变迁	95
5.4	金葡菌基因组背景与生物被膜的相关性	96
5.4.1	262 株金葡菌指纹图谱及基因相似性分析	97
5.4.2	262 株金葡菌基因组背景研究	99
6	金葡菌生物被膜的分子机制研究	105
6.1	金葡菌生物被膜形成能力的研究与分析	105
6.1.1	结晶紫染色法对流行性金葡菌生物被膜总量的定量分析	106
6.1.2	XTT 染色法对流行性金葡菌生物被膜代谢活性的定量分析	107
6.1.3	结晶紫染色法与 XTT 染色法对比	108
6.1.4	耐药型金葡菌与敏感型金葡菌生物被膜形成能力对比	112
6.1.5	生物被膜形成能力的 SCCmec 基因组背景研究	114
6.1.6	小结	116
6.2	金葡菌生物被膜的基因型	117
6.2.1	金葡菌生物被膜相关基因	117
6.2.2	金葡菌生物被膜相关基因检测	118
6.2.3	金葡菌生物被膜基因型分析	125
6.2.4	基因组岛 SCCmec 与生物被膜基因型的相关性	127
6.2.5	金葡菌克隆株与生物被膜基因型的相关性研究	141
6.2.6	小结	145
6.3	金葡菌生物被膜的形成与发展	146
6.3.1	金葡菌生物被膜的形成	146
6.3.2	不同阶段金葡菌生物被膜的形成特性研究	147
6.3.3	基因型与生物被膜形成的相关性研究	151
6.3.4	小结	156
6.4	金葡菌生物被膜的抑制与清除	157
6.4.1	右旋龙脑和溶菌酶质量浓度对金葡菌被膜的影响	158
6.4.2	右旋龙脑和溶菌酶作用时间对金葡菌被膜的影响	159
6.4.3	单独及联合方法对金葡菌黏附的抑制作用	161
6.4.4	单独及联合方法对生物被膜形成的抑制作用	162
6.4.5	单独及联合方法对生物被膜成熟及分化的抑制作用	163

6.4.6	光学显微镜对生物被膜的观察	164
6.4.7	扫描电镜对生物被膜的观察	165
6.5	食品加工条件对金葡菌生物被膜形成的影响	166
6.5.1	温度对金葡菌生物被膜形成的影响	167
6.5.2	pH 对金葡菌生物被膜形成的影响	168
6.5.3	TSB 配比对金葡菌生物被膜形成的影响	169
6.5.4	葡萄糖质量分数对金葡菌生物被膜形成的影响	170
6.5.5	NaCl 质量分数对金葡菌生物被膜形成的影响	171
6.5.6	小结	172
6.6	金葡菌生物被膜中羧甲基赖氨酸的生成	173
6.6.1	生物被膜中羧甲基赖氨酸的生成规律	173
6.6.2	食品加工过程中羧甲基赖氨酸的生成规律	185
6.6.3	小结	191
参考文献		192

1

食品中的微生物安全

1.1 食品安全概述

食品工业是我国重要的支柱产业之一，2015 年食品工业总产值超 12 万亿元人民币，占国民经济总量的十分之一以上。然而随着食品工业的发展，食品安全问题也随之增多，同时也越来越引起国家和社会的关注。2008 年“三聚氰胺”事件后，2009 年全国两会将食品安全问题定为焦点话题，同期全国人大常委会通过《食品安全法》，而 2015 年新修订通过的《食品安全法》被称为“史上最严”的食品安全法，更显示了食品安全的严重性与重要性，食品安全问题已成为最需关注的热点问题之一。

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)对食品安全的定义是，食品无毒、无害，符合应有的营养要求，对人体健康不造成任何急性、亚急性或者慢性危害。在学科上，食品安全则是一个探讨如何在食品加工、存储、销售等过程中确保食品卫生及食用安全、降低疾病隐患、防范食物中毒的专业领域。在食品安全专业领域中，致病性微生物、食源性疾病、食品安全是密切相关的内容。食品安全问题贯穿于从农场到餐桌(farm to table)的整个过程。从农场获取的食品原料开始，特别是植物性食品原料，容易受到环境(如土壤)中的微生物污染；随后，在食品加工和保存过程中，富含营养的食品以及环境因素等亦容易为微生物生长提供适宜条件。因此，微生物的污染同样贯穿从农场到餐桌的整个过程。食用被微生物污染的食物，可致人体患上食源性疾病。

食源性疾病是指通过摄食而进入人体的有毒、有害物质(包括生物性病原体以及各类添加剂)所造成的疾病，一般可分为感染性和中毒性，包括常见的食物中毒、肠道传染病、人畜共患传染病、寄生虫病以及化学性有毒、有害物质所引起的疾病。其中，微生物感染是引起食源性疾病的主因，居食源性疾病的首位。据统计，美国每年发生食源性疾病 4780 万例，法国 75 万例，澳大利亚 540 万例，其范围和影响在不断扩大，因此，致病性微生物的食品安全性问题是食品安全专业领域的重要研究内容之一。

1.2 葡萄球菌食物中毒及其流行病学特点

1.2.1 葡萄球菌细菌性食物中毒

食物中毒是指人体因食用了含有致病性微生物及其毒素、化学性有害物质的食物而出现的非传染性的中毒，分为化学性食物中毒与微生物性食物中毒，后者又根据致病微生物类群不同，分为细菌性食物中毒和真菌性食物中毒。

由细菌污染引起的食源性疾病是影响人类公共健康的常见疾病之一。每年食源性病原体导致 1400 万人患病，60 000 人住院，1800 人死亡^[1]。其中，由葡萄球菌引起的食物中毒事件占多数，成为食品安全领域的重点课题之一，突出的代表是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*，简称金葡菌)^[2~4]。

葡萄球菌直径为 0.5 ~ 0.8 μm，多无荚膜，在显微镜下可见其呈葡萄串状排列(图 1-1)。金葡菌为革兰氏阳性菌的代表，具有很强的环境适应性，可耐受 70℃ 的温度 1 h 或 80℃ 的温度 30 min 而不被杀死，可在冷冻食物中生存，可在质量分数为 15% 的氯化钠溶液和体积分数为 40% 的胆汁溶液中生长，故此菌可在多种食物中存活。葡萄球菌分布广泛，遍布空气、水、灰尘等公共环境中，在人体主要寄生于鼻前庭黏膜、腹股沟、会阴部和新生儿脐带残端等部位，偶尔也寄生于口咽部、皮肤、肠道及阴道口等，50% 以上健康人的皮肤上都有葡萄球菌的存在，30% ~ 80% 的人为该病原菌的携带者^[2,5]，人畜化脓性感染部位常成为感染源。在温度条件适宜时，污染的葡萄球菌在 8 ~ 10h 内即可积累相当数量的葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)；SEs 可耐受 100℃ 煮沸 30 min 而不被破坏。

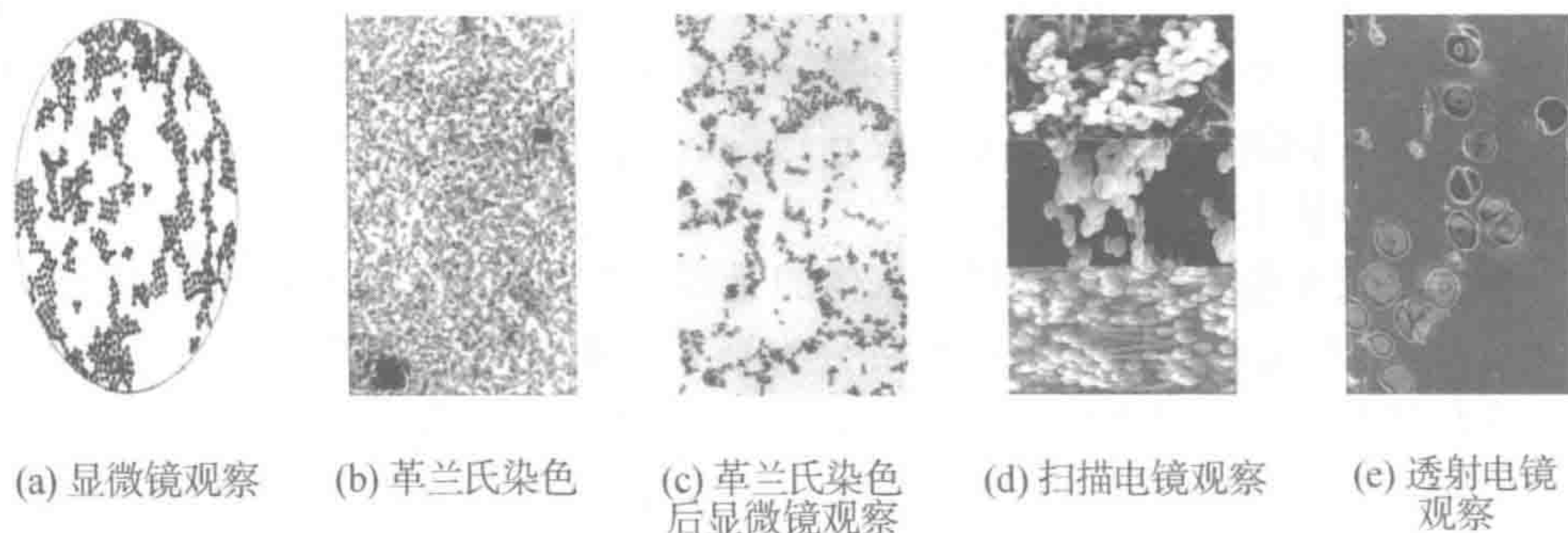


图 1-1 葡萄球菌的形态学观察

作为最重要的食源性疾病之一，葡萄球菌食物中毒现象在全球广泛存在^[6,7]。在美国，由葡萄球菌引起的食源性疾病在所有食源性疾病中排第五位，在 1983 年至 1997 年间，每年由葡萄球菌引起的食源性疾病约 185 000 例，其中住院 1750 例，

死亡2例,总花费15亿美元^[8,9];2011年的数据显示,每年由葡萄球菌引起食物中毒的平均病例数为241 148,其中1064例病人住院,6人死亡^[8,10]。在欧洲,由葡萄球菌引起的食物中毒在所有常见病原体引起的食源性疾病中排第四位。1993年至1998年间,15个欧洲国家共发生926次葡萄球菌食物中毒^[9,11]。日本卫生福利部统计,日本20年间(1980—1999年)爆发2525次葡萄球菌食物中毒,涉及59 964人,导致3人死亡^[7]。2000年日本爆发一次广泛的葡萄球菌食物中毒,因误食葡萄球菌肠毒素污染的奶制品,导致13 420人发病^[12]。在中国,大部分地区15%以上的食品样品中存在金黄色葡萄球菌,且在偶然爆发的食物中毒事件中,90%以上是由金黄色葡萄球菌引起^[9,13,14]。然而,因为缺少全面的监管和调查,葡萄球菌食物中毒的患病率和发生率在中国不同地区的变化很大。差异的原因可能是各地饮食习惯不同;此外,葡萄球菌菌株依赖性的不同也可能造成差异。

需要手工制作且没有进一步烹饪或者在制备过程中频繁处理的食物是金葡菌污染的主要目标对象,并且极易产生细菌毒素,最终导致葡萄球菌食物中毒。常见易携带葡萄球菌内毒素的食物有火腿、生的或加工过的肉类、糕点、金枪鱼、鸡、三明治馅、奶油馅、土豆和肉类沙拉、奶油冻、原料奶、奶类制品(特别是未经高温消毒的牛奶)、奶酪产品、乳状马铃薯等^[15,16]。在中国,生肉、生奶以及奶制品、冷冻产品以及熟食已经成为受金黄色葡萄球菌污染的主要食品种类,污染比例分别占38%、20%、16%和14%^[9,10,13]。在欧洲,肉类以及相关制品是常见的葡萄球菌易感染载体。在日本,葡萄球菌食物中毒常发生在饭团以及一些日式小吃中^[17]。尽管金葡菌污染可以通过热处理加以避免,但金葡菌极强的生存能力(7~48.5℃,pH 4.2~9.3,耐受质量分数高达15%的盐溶液)使其轻易污染各种非杀灭条件下的食品并得以传播^[6,7,18,19]。

1.2.2 葡萄球菌的流行病学特性

葡萄球菌引起食物中毒的传染源,主要包括被其污染了的动物或人。污染食品的途径主要分为加工前(食品原料受到细菌污染,使食品在加工前已受到污染,如奶牛患化脓性乳腺炎或禽畜局部化脓时对肉体其他部位的污染)、加工过程(如在加工过程加热处理不足、由于加工设备清洁消毒不足而污染食品,或携带病菌的食品加工人员和炊事员造成食品污染)、加工后(熟食制品包装不严、冷藏不足、存放时间过长或运输过程受到污染等)和煮食过程(如生熟食品交叉、加热不足等)。被污染食品的危害程度与肠毒素的数量呈正相关,一般影响肠毒素形成的条件包括:①细菌污染的程度,如污染程度严重,即单位食物中含大量葡萄球菌并快速繁殖,则易于形成毒素;②保存温度,如食物存放的温度越高,则产毒时间越短;③保存环境,食物存放的环境通风不良易形成肠毒素;④食品成分,如含蛋白质丰富、水分多,同时含一定量淀粉的食物,或含油脂较多的食物,由于细菌更容易滋生,因此肠毒素易于生成。在季节分布方面,葡萄球菌一般多见于春夏季。在分离

率方面,如上所述,一般营养丰富、水分充足以及一些含淀粉较多的食品,如各类生肉制品、牛奶和乳制品、速冻食品、肉、蛋和蛋制品及熟食等,有利于葡萄球菌的大量繁殖。生肉中的葡萄球菌主要来源于动物本身、加工人员、加工处理方法及环境。生肉在食物链中对食源性致病菌的传播起重要的作用,因为受污染的生肉往往成为其他产品(如熟食、熟肉制品等)污染的重要来源^[20]。不同的动物种属,饲养、加工和销售环境,肉类的金葡菌分离率也有一定差异。相比之下,生肉制品由于加工工序较多,污染程度高于生鲜肉^[21]。在牛奶和各种乳制品中,葡萄球菌的检出率在不同国家及地区之间有较大差异,一般波动在12%~79%之间^[22],在我国一般在15%~38%^[22~26]。污染来源主要包括:①患有乳腺炎的奶牛,据报道,世界上有1%~2%的奶牛患有各种类型的乳腺炎,而金葡菌是引起乳腺炎的主要病原菌之一,患有乳腺炎的奶牛对生鲜乳造成污染^[27];②贮藏与加工处理环境,在生鲜乳挤出后,由于贮藏罐、保存环境等消毒不合格,会造成生鲜乳的二次污染,据报道,奶桶和农场奶罐中金葡菌的污染率分别为65.9%和65.4%^[21];以上原因共同导致生鲜乳中金葡菌的高检出率。在低温冷冻食品中,金葡菌仍能生存。据报道,冰棍中金葡菌可存活2年以上,而在模拟冰淇淋中可存活7年之久^[21,28]。因此,冷冻食品一旦被金葡菌污染,则可长时间带菌,并在被食用后引起人体中毒反应。

近年来,世界范围内的细菌性食物中毒事件屡屡发生,无论是在发达国家还是在发展中国家,细菌性食物中毒成为一个不断扩大的全球性公共卫生问题。对菌种类型的快速检测和准确鉴定,是对细菌性食物中毒进行预防与监控的首要步骤。葡萄球菌的常规鉴定包括样品处理、增菌培养、分离培养和染色观察,阳性结果需要进一步通过凝固酶试验或分子生物学方法确认。由于增菌与选择性培养需48~72h,因此常规鉴定流程耗时多,可长达6d,难以达到细菌性食物中毒爆发后对致病微生物快速检测的要求。随着葡萄球菌在食物中毒的分离率逐年上升^[2~4],开发一种快速检测和鉴定葡萄球菌的方法成为当务之急。

食品安全研究的对象是食品中的有毒有害物质,传统定义上,被理解为能引起食源性疾病如急性食物中毒、肠道传染病和寄生虫病等的有毒有害物质,但抗生素滥用引起的长期与慢性毒害则被忽视。超时、超量、不对症和未严格规范使用抗生素等现象的泛滥,使我国成为全球抗生素滥用最严重的国家之一。我国抗生素每年人均消费量约138g,是美国的10倍,位于全球第一;每年有6000t抗生素用于饲料添加剂,占全球抗生素饲料添加剂使用量的50%,其严重的后果是细菌耐药性的出现和增强。作为潜在“超级细菌”之一的葡萄球菌,对其耐药性的发展和监控日益受到关注。近年大量耐药葡萄球菌在畜牧业及食品中被发现,耐药葡萄球菌不但对食品本身,同时对所有从事食品加工和处理的人员,也是一个潜在的危险因素^[29~32]。畜牧业中大量耐药性葡萄球菌的发现,成为近年来社区来源葡萄球菌分离率不断增高的可能原因之一。因此,葡萄球菌的耐药性及其传播和侵袭机制不应

局限于传统的临床医学学科，而应扩展为重要的食品安全问题。

1.3 葡萄球菌的致毒性

葡萄球菌，尤其是金葡菌，是引起人类食物中毒最常见的病原菌，在全球范围内具有很高的发病率和病死率，其致病力的强弱主要取决于产生毒素和侵袭性酶的能力。葡萄球菌食物中毒是由摄入带有肠毒素的食物引起的，低死亡率，伴随恶心、呕吐、胃痉挛、疲惫和腹泻等症状^[1,11]。葡萄球菌食物中毒通常在0.5~6 h内发病，一般持续1 d，最多3 d，就可以很快康复^[1]。

1.3.1 葡萄球菌肠毒素

葡萄球菌肠毒素(SEs)是在特定条件下由葡萄球菌分泌的一类结构相似、毒力相似，而抗原性各不相同的胞外单链小分子蛋白质，属于致热毒素超抗原家族成员，是葡萄球菌引起细菌性食物中毒的最主要致病因子，摄入后可能会引起中毒，表现为呕吐和腹泻，严重者可出现虚脱、休克^[33]。金葡菌和部分凝固酶阴性葡萄球菌包括表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌等均可以产生肠毒素^[34~36]。大多数葡萄球菌食物中毒事件中，往往是从受污染的食品中分离出来上述产生肠毒素的葡萄球菌^[37]。葡萄球菌肠毒素具有相似且多变的结构，含少量 α -螺旋和大量 β -折叠片，相对分子质量较低，24 000~30 000 g/mol^[38]，根据其抗原性和等电点的不同分为SEA、SEB、SEC、SED、SEE五种类型^[39]，其中SEC又分为SEC1、SEC2和SEC3三种亚型。SEs具有热稳定性的特点(121℃加热10 min不失活)，在温度10~50℃范围均可产生SEs，30~40℃最适宜^[17,19,40~42]；葡萄球菌细胞在80℃下经30 min即可被杀灭，而SEs可耐受100℃高温煮沸30 min还保持生物活性和免疫活性^[43]，必须在218~248℃下经30 min才能使其毒性完全丧失。当食物中的葡萄球菌在低于适宜温度下生存，味觉和嗅觉无法察觉食物变质的情况下，即使加热除去菌体，SEs仍保持活性。因此，最有效的方法是防止食物被葡萄球菌污染，抑制葡萄球菌生长，避免其在适宜温度条件下产生SEs。SEs高度亲水，水分活度(a_w)在0.87~0.99之间，最适水分活度为0.90；在pH 4.9~9.0之间不被破坏，最适pH为5.3~7.0^[17,44,45]。SEs具有超抗原性，可刺激非特异性T淋巴细胞增殖和诱导干扰素合成，只需极低浓度即可激活大量的T淋巴细胞活化并诱导其产生极强的免疫应答因子。此外，SEs还具有催吐活性以及致热性^[46]。葡萄球菌食物中毒除了引起胃肠道症状和急性中毒外，SEs也见于其他疾病，如过敏性湿疹^[47~49]、类风湿性关节炎^[49~51]和荨麻疹^[49,52]等。

以前是根据不同的免疫学实体对SEs进行分类的，直到最近SEs的发现和分类才依据鉴定方法的发展而不断更新和确定，目前已知有25类SEs(A~V和X，其中C类有三个亚型)。早期研究多使用动物(如猴子、猫等)实验来检测SEs的活