

广州市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药分析

张健, 陈惠玲, 邓志爱, 罗健梅, 刘巧谊, 吴新伟, 白志军

广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440

摘要: **目的** 了解广州地区食品和食物中毒样品中金黄色葡萄球菌产肠毒素和耐药性情况。 **方法** 按食品安全国家标准和相关文献对 2010–2016 年广州市疾病预防控制中心微生物实验室从食品和食物中毒样品中分离并保存的 118 株金黄色葡萄球菌进行了肠毒素和药敏试验。 **结果** 118 株金黄色葡萄球菌有 70 株产肠毒素, 产毒率为 59.32%, 快餐类食品和食物中毒样品的产毒率偏高。以荧光 PCR 方法对 70 株肠毒素阳性的菌株进行肠毒素 A–E 分型, 其中 SEA 检出率为 29.20%、SEB 17.70%、SEC 11.50%、SED 15.93%、SEE 25.67%; 携带两种或以上毒力基因的产毒菌株占 41.42%。在受检的菌株中, 有 104 株菌不同程度的对一种或多种的抗生素有抗性, 占 88.14%; 青霉素 G 耐药率高达 71.19%; 检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 5 株, 占 4.24%, *mecA* 耐药基因检测阳性。 **结论** 广州市食源性金黄色葡萄球菌中产肠毒素菌株较多, 且存在耐药株, 甚至 MRSA, 应加强对广州市食品安全风险的监管。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 耐药性; 食品安全

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2018)04–0398–03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2018.04.004

Enterotoxins and drug resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* in Guangzhou City

ZHANG Jian, CHEN Hui-ling, DENG Zhi-ai, LUO Jian-mei, LIU Qiao-yi, WU Xin-wei, BAI Zhi-jun

Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China

Abstract: **Objective** To investigate the presence of enterotoxins and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in food and food poisoning samples in Guangzhou City. **Methods** According to the national food safety standards and related literatures, the presence of enterotoxins and antimicrobial resistance was examined in 118 strains of *S. aureus* isolated from food and food poisoning samples and preserved in the Microbiology Laboratory in Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention during 2010–2016. **Results** Among the 118 strains of *S. aureus*, 70 (59.32%) were capable of producing enterotoxins, and fast food and food poisoning samples had higher positive rates. Enterotoxins (SEA–SEE) of the 70 enterotoxin-producing strains were examined by fluorescent PCR assay, and the positive rates of SEA, SEB, SEC, SED and SEE were 29.20%, 17.70%, 11.50%, 15.93% and 25.67% respectively. 41.42% of the enterotoxin-producing strains contained two or more kinds of enterotoxins. Among the 118 strains detected, 104 (88.14%) were resistant to one or more antimicrobials. The positive rate of penicillin G resistance reached 71.19%. 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were detected, accounting for 4.24%. Methicillin resistance gene (*mecA*) was also detected. **Conclusions** Supervision on the food safety risk should be strengthened in Guangzhou City since the positive rates of enterotoxins and antimicrobial resistance of *S. aureus* are high and MRSA is presented.

Key words: *Staphylococcus aureus*; enterotoxin; antimicrobial resistance; food safety

金黄色葡萄球菌广泛分布于自然界, 是一种引起人类和动物化脓性感染的重要致病菌, 也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一。全球许多研究发现^[1–3], 金黄色葡萄球菌可产生一种对热稳定的肠毒素, 可引起食物中毒, 造成肠道外感染, 甚至对全身各

器官组织产生损伤作用, 最后发展到多个器官功能障碍, 危及患者生命。因此许多学者把目光投入到金葡肠毒素的研究中。另一方面, 随着广谱高效抗菌药物尤其是第三代头孢菌素在临床治疗及养殖业的广泛使用, 大量金黄色葡萄球菌耐药菌株的出现已受到各国政府和科学家的关注^[4–5]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 在金黄色葡萄球菌感染中所占的比例也越来越高。为了解广州地区食品和食物中毒样品中金黄色葡萄球菌产肠毒素和耐药性情况, 对本实验室分离并保存的 118 株金黄色葡萄球菌菌株进行了检测分析, 现将结

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(A2016608); 广州市医学重点学科建设项目(授权号 2017–2019–07); 广东省科技计划项目(2016A020215217); 广州市科技计划项目(201707010130)

作者简介: 张健(1976–), 女, 本科学历, 副主任技师, 主要从事微生物检验工作。

果报告如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源 选择 2010–2016 年间本实验室从食品和食物中毒样品中分离并保存的金黄色葡萄球菌菌株做分析,共计 118 株。

1.2 主要仪器与试剂 全自动微生物分析仪鉴定(法国梅里埃公司),GP67 生化鉴定卡(法国梅里埃公司),头孢西丁药敏纸片(fluka 公司),金葡肠毒素检测试剂盒(法国梅里埃公司),荧光 PCR 扩增仪(ABI 7500),荧光 PCR 金葡肠毒素 A、B、C、D、E 分型试剂盒(深圳生科源技术有限公司),普通 PCR 扩增仪和 Gel Doc XR 凝胶成像系统(均为伯乐公司),TaKaRa EX Taq 和 PCR 缓冲液(大连宝生物公司)。其他使用的增菌液、平板和试剂均由本中心供应部按照国标配制,现配现用。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 检验方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌肠毒素检测 金黄色葡萄球菌肠毒素检测采用法国生物梅里埃公司 miniVIDAS 全自动化荧光酶标免疫测试系统进行初筛。阳性的菌株再用荧光 PCR 方法做肠毒素 A–E 的分型。

1.3.2 金黄色葡萄球菌药敏试验 采用法国生物梅里埃公司 VITEK–2 全自动微生物鉴定及药敏分析系统对分离的金黄色葡萄球菌进行药物敏感试验。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)鉴定用头孢西丁药敏纸片做平板筛选。

1.3.3 质控菌株 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923,购自中国药品生物制品检定所。

1.3.4 *mecA* 耐药基因检测 利用耐甲氧西林金黄色葡萄球菌特有的 *mecA* 基因设计引物,*mecA*–P1 (5′–aaaatcgatggttaaaggttggc–3′),*mecA*–P2 (5′–agttctgcag-taccggatttgc–3′)。引物由昊天生物公司合成。以煮沸法制备金黄色葡萄球菌 DNA 基因组模板。PCR 反应条件为预变性 94 ℃、5 min;94 ℃、45 s,56 ℃、45 s,72 ℃、45 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。取 8 μl PCR 产物,置 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察结果并拍照。扩增产物在 533 bp 左右。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌菌株来源 从资料记录分析,菌株来源于熟肉制品、生鲜肉、焙烤食品、食物中毒样品、凉拌菜、快餐食品等 6 类食品。

2.2 金黄色葡萄球菌肠毒素检测 118 株金黄色葡萄球菌有 70 株产肠毒素,产毒率为 59.32%。统计 6

类样品的菌株产毒率,快餐类食品 76.92%,食物中毒样品 72.00%,焙烤食品 65.21%,凉拌菜 57.14%,熟肉制品 42.86%,生鲜肉 3.75%,见表 1。以荧光 PCR 方法对 70 株肠毒素阳性的菌株进行肠毒素 A–E 分型,共得到了 113 个分型结果,其中 SEA 有 33 个(29.20%)、SEB20 个(17.70%)、SEC 13 个(11.50%)、SED18 个(15.93%)、SEE29 个(25.67%)。同时携带两种毒素基因的菌有 19 株,占肠毒素阳性菌株的 27.14%;携带三种的有 6 株,占 8.57%;携带四种的有 4 株,占 5.71%;其余的均为携带一种毒素基因的,占 58.58%。

表 1 金黄色葡萄球菌分离株肠毒素检测

类别	金黄色葡萄球菌(株)	产肠毒素金黄色葡萄球菌(株)	肠毒素阳性率(%)
熟肉制品	28	12	42.86
生鲜肉	8	3	3.75
焙烤食品	23	15	65.21
食物中毒样品	25	18	72.00
凉拌菜	21	12	57.14
快餐食品	13	10	76.92
合计	118	70	59.32

2.3 金黄色葡萄球菌药敏检测 118 株金黄色葡萄球菌分别用 18 种抗生素做耐药测试,14 株菌对全部测试的抗生素敏感,占 11.86%,其余的 104 株菌不同程度的对一种或多种的抗生素有抗性,占 88.14%。青霉素 G 耐药率高达 71.19%,其余依次为四环素 32.20%,红霉素 29.66%,氯林霉素 24.58%,诱导克林霉素耐药 13.56%,环丙沙星 8.47%,头孢西丁 4.24%,苯唑西林 4.24%,复方新诺明 4.24%,利福平 2.54%,庆大霉素 1.69%,左氧氟沙星 1.69%,对莫西沙星、达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素均没有检测到耐药菌株,见表 2。受检的菌株中有 53 株呈现多重耐药的现象,占 44.92%。两重耐药的菌株占 20.34%,三重耐药占 3.39%,四重耐药占 11.02%,五重及以上占 10.16%。根据菌株对头孢西丁和苯唑西林耐药测试,鉴定出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)5 株,占 4.24%。

表 2 金黄色葡萄球菌分离株药敏试验

抗生素	S		I		R	
	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
头孢西丁	113	95.76	0	0.00	5	4.24
苯唑西林	113	95.76	0	0.00	5	4.24
青霉素 G	34	28.81	0	0.00	84	71.19
呋喃妥英	116	98.31	2	1.69	0	0.00
红霉素	83	70.34	0	0.00	35	29.66
氯林霉素	89	75.42	0	0.00	29	24.58

续表 2

抗生素	S		I		R	
	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
利福平	115	97.46	0	0.00	3	2.54
四环素	80	67.80	0	0.00	38	32.20
环丙沙星	106	89.84	2	1.69	10	8.47
庆大霉素	113	95.76	3	2.54	2	1.69
左氧氟沙星	111	94.07	5	4.24	2	1.69
复方新诺明	113	95.76	0	0.00	5	4.24
诱导克林霉素耐药	102	86.44	0	0.00	16	13.56
莫西沙星	118	100.00	0	0.00	0	0.00
达福普汀	118	100.00	0	0.00	0	0.00
利奈唑胺	118	100.00	0	0.00	0	0.00
万古霉素	118	100.00	0	0.00	0	0.00
普加环素	118	100.00	0	0.00	0	0.00

注:S-敏感;I-中间敏感;R-耐药。

2.4 *mecA* 耐药基因检测 5 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌均检出 *mecA* 基因,结果见图 1。3 份来自于食品,分别是熟肉制品、焙烤食品、快餐食品各 1 份;2 份来自于食物中毒样品中的密切接触者的肛拭子。



注:M: DL1500DNA marker;1:分离到的一株 MRSA;2:阳性对照;3:阴性对照。

图 1 MRSA 的 *mecA* 基因电泳图

3 讨论

金黄色葡萄球菌引起的食物中毒是世界范围内普遍存在的食源性疾病,其致病因子是热稳定性肠毒素,而不是金黄色葡萄球菌本身,其中由 SEA-SEE 引起的中毒占金黄色葡萄球菌毒素中毒的 95%^[6-7],因此监测金黄色葡萄球菌,并做肠毒素分型研究,对研究并预防金黄色葡萄球菌的危害显得有意义。本次研究结果显示,广州市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素阳性率较高,达 59.32%,与贵州省(60.50%)和北京市顺义区(55.90%)监测结果相似^[8-9]。肠毒素 A-E 分型的结果说明,广州市的食源性金黄色葡萄球菌肠毒素带一种毒力基因的居多,但依然存在带两种或以上毒力基因的菌株,SEA 检出率仍然居首位,与以往报道中最常见的污染食品的肠毒素相一致^[10],但另一方面,

SEE 的检出率紧随其后,提醒广州市食品存在受肠毒素 E 的金黄色葡萄球菌污染的问题。

近年来,随着广谱高效抗菌药物尤其是第三代头孢菌素在临床治疗及养殖业的广泛使用,大量耐药菌株的出现已受到各国政府和科学家的关注,食源性金黄色葡萄球菌已出现了多重耐药菌株。本次研究表明,广州市食源性金黄色葡萄球菌耐药比较严重。尽管 MRSA 的检出率为 4.24%,远低于临床 MRSA 的检出率(44.9%)^[11],但这检出的 5 株 MRSA 来源于不同的食品类别,说明广州市不同的食品类别均存在受 MRSA 污染的风险。其次,结果显示对青霉素、四环素、红霉素和氯林霉素等耐药菌株均超过了 20% 以上,并且接近半数的菌株具有多重耐药性,是广州本地食源性风险之一。因此,各级食品安全监督部门应加强食品市场的监管,建立食品安全质量控制体系。同时,应建立和公布耐药监测网,减少药物滥用,谨慎添加动物饲料的抗菌药,防止细菌耐药性加重。

参考文献

[1] 韩乃寒,刘映,赵燕英,等. 金黄色葡萄球菌肠毒素研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015,15(1):181-187.

[2] Argudin MA,Mendoza MC,Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins[J].Toxins,2010,2(7):1751-1773.

[3] 周湘晖,刘帅仁,萧福元,等. 2013-2015 年湘潭市食品中金黄色葡萄球菌和沙门菌的污染状况及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2016,23(8):989-991.

[4] 诸葛石养,郭世辉,苏爱荣,等. 食源性和病源性金黄色葡萄球菌分离鉴定和耐药性研究[J]. 实用预防医学,2013, 20(11):1395-1397.

[5] Normanno G, Corrente M, Salandra GL, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy [J]. Int J Food Microbiol,2007,117(2):219-222.

[6] 周黎,周倩,朱玫,等. 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.

[7] 王园园,李颖,朱美娟,等. 北京市顺义区食源性金黄色葡萄球菌肠毒素分型方法研究[J]. 首都公共卫生,2015,9(3):123-125.

[8] 徐奋奋,徐景野,黄亚琴,等. 89 株不同来源金黄色葡萄球菌耐药及肠毒素基因分析[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(7):1054-1056.

[9] 陈万义,游春萍,刘振民,等. 金黄色葡萄球菌肠毒素的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2015, 38(6):31-36.

[10] 向红,周黎,廖春,等. 多重 PCR 技术在检测食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因中的应用[J]. 现代预防医学,2015,42(21):3949-3951.

[11] 陈巧巧,吕婉飞,毛雄英,等. 社区感染和医院感染 MRSA 耐药表型和分子分型的对比研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015, 25(11):1853-1855.