

食源性 MRSA 双色荧光 PCR 检测方法建立

郑秋月^{1*}, 战晓微², 那 晗¹, 徐君怡¹, 曹际娟¹

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866)

摘 要: **目的** 建立快速检测食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) Taqman 探针双色荧光 PCR 方法。**方法** 根据金黄色葡萄球菌种属鉴定 *nuc* 基因和 MRSA 决定因子 *mecA* 基因, 设计合成引物探针, 建立双色荧光 PCR 扩增体系。利用所建立的方法检测特异性及灵敏度。将金黄色葡萄球菌依次传代培养, 检测不同代次的菌株验证方法的稳定性, 并对实际样品分离株进行检测验证方法的可行性与实用性。**结果** 该方法可准确并特异性检测出 MRSA 和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA), 检测 MRSA 的 *nuc* 基因和 *mecA* 基因的灵敏度可达 2.7×10^3 CFU/mL, 不同代次的菌株的检测结果一致。**结论** 本实验所建立的双色荧光 PCR 检测方法具有良好的特异性、灵敏度及稳定性, 可用于快速检测食源性 MRSA。

关键词: 食源性; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 双色荧光 PCR; 检测

Establishment of double-colored real-time fluorescence PCR methods for detection of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ZHENG Qiu-Yue^{1*}, ZHAN Xiao-Wei², NA Han¹, XU Jun-Yi¹, CAO Ji-Juan¹

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

ABSTRACT: Objective To establish a double-colored real-time fluorescence PCR method of detection of foodborne *Staphylococcus aureus* by Taqman probe. **Methods** Two pairs of specific primers and Taqman fluorescent probe were designed and synthesized according to *nuc* gene for species identification of *S. aureus* and *mecA* gene for determination gene of MRSA. Double-colored real-time fluorescence PCR amplification system was developed. The specificity and sensitivity were tested by the established method. In order to validate the stability of method, strains of different generations were tested, after strains of *S. aureus* were subcultured successively. The feasibility and practicality were studied by detecting isolates from practical samples. **Results** MRSA and MSSA could be detected accurately, rapidly and specifically in this study. The sensitivity of detection method was 2.7×10^3 CFU/mL for *nuc* and *mecA* gene of MRSA. The detection results of different generations were consistent. **Conclusion** This method has high specificity, sensitivity and stability for double-colored real-time fluorescence PCR method, and it can be applied to rapid detection and identification of foodborne MRSA.

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210043)

Fund: Supported by the Public Welfare Industry Scientific Research Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (201210043)

*通讯作者: 郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: zhengqyciq@163.com

*Corresponding author: ZHENG Qiu-Yue, Doctor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang east Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: zhengqyciq@163.com

KEY WORDS: foodborne; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; double-colored real-time fluorescence PCR; detection

1 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)广泛存在于自然界中,是一种可引起人类、动物感染的常见致病菌。由于其可产生肠毒素,也是引起人类食物中毒的主要原因,有报道称其在北美地区引起食物中毒事件占整个细菌性食物中毒的33%以上^[1]。此外,随着近年来抗生素的广泛应用及大量滥用,金黄色葡萄球菌的耐药菌株不断出现,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,不但由于其产生肠毒素危害人类健康,也因其耐药性导致人畜感染后很难治疗甚至难以控制,危害严重。此外,MRSA除对甲氧西林耐药外,常对绝大多数 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类等抗生素产生多重耐药,易造成爆发性流行,发病率及病死率均较高,甚至引起严重的经济损失或公共卫生问题^[2]。近年来,动物源性MRSA检出率呈上升趋势,这可能造成食品的污染,进而感染人类。王登峰等^[3]2011年报道中国五省区不同牛场分离的54株金黄色葡萄球菌中有6株MRSA,王雪敏等^[4]2013年报道上海地区猪源性金黄色葡萄球菌中MRSA的检出率达30.2%。邓波等^[5]2011年报道2009年临床分离的MRSA达58.5%,上升趋势增加了耐药性流行传播的几率。

目前,在出入境检验检疫中针对MRSA的检测方法仅有出入境检验检疫行业标准《动物及其制品中细菌耐药性的测定-纸片扩散法》SN/T1944-2007^[6],该方法受人为操作影响大,易造成漏检。同样根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐标准检测的全自动微生物鉴定及药敏检测系统检测费用昂贵,且此两种方法均存在操作繁琐,耗时长等问题。另外,根据2011年CLSI推荐^[7],通过*mecA*基因检测MRSA的方法逐渐被用于检测^[8]及MRSA的分型研究^[9]中。本实验利用该原理采取双色荧光PCR技术,建立了一种针对*nuc*基因和*mecA*基因快速检测鉴定金黄色葡萄球菌及MRSA的双色荧光PCR检测方法。

2 材料与方法

2.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC33591(MRSA 菌株)、金黄色葡萄球菌 ATCC29213(MSSA 菌株),9株金黄色葡萄球菌(分离于食品及食物中毒患者)、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌及沙门氏菌为本实验室保存食品分离菌株。

2.2 试剂与仪器

培养基 baird parker 琼脂(B-P)(赛默飞世尔生物化学制品公司); Mueller-Hinton(M-H)、TSA 琼脂、TSB 肉汤(英国 OXOID); 苯唑西林(OXA)(杭州天和微生物); prepman ultra 细菌提取试剂(美国 AB 公司); TaqDNA 聚合酶、dNTPmixture、DNA marker、Goldview(大连宝生物公司); PCR 引物(大连宝生物公司合成)。

PHOENIX-100 微生物自动鉴定系统(美国 BD 公司); PCR 扩增仪(TC3000G, 英国 TECHNE 公司); 微量紫外可见光分光光度计(NANODROP2000C, Thermo 公司); 电泳仪(600SI, 上海博彩生物科技有限公司); 凝胶成像系统(GBOX-F3, GENE 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(LC480, Roche)。

2.3 实验方法

2.3.1 金黄色葡萄球菌鉴定及药敏实验

根据金黄色葡萄球菌检验 GB/T4789.10-2010 方法^[10]分离鉴定金黄色葡萄球菌,利用微生物自动鉴定系统检测及纸片扩散法检测其耐药性,纸片法参照《动物及其制品中细菌耐药性的测定纸片扩散法》SN/T1944-2007^[6],根据美国临床和实验室标准研究所(CLSI)判定结果,质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

2.3.2 金黄色葡萄球菌 DNA 提取

以 prepman ultra 细菌提取方法提取细菌 DNA,使用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,-20℃保存。电泳:取 PCR 产物 10 μ L 上样,3%琼脂糖电泳,电压为 200 V,电流 190 mA,电泳时间为 20 min,电泳结束后,将胶置于凝胶成像系统下鉴定。

2.3.3 双色实时荧光 PCR 检测方法建立

(1) 引物探针

参考文献, 设计合成引物和探针, *nuc* 基因上游引物 5'-AAA TTA CAT AAA GAA CCT GCG ACA-3', 下游引物 5'-GAA TGT CAT TGG TTG ACC TTT GTA-3', 探针 5'-FAM-AAT TTA ACC GTA TCA CCA TCA ATC GCT TT-BHQ1-3'; *mecA* 基因上游引物 5'-AAA GAA CCT CTG CTC AAC AAG T-3' 下游引物 5'-TGT TAT TTA ACC CAA TCA TTG CTG TT-3' 探针 5'-HEX-CCA GAT TAC AAC TTC ACC AGG TTC AAC T-BHQ1-3^[11]。 *nuc* 常规 PCR 上游引物 5'-AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA-3', 下游引物 5'-TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT-3^[12], 预扩增片段 400 bp; 上游引物 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3', 下游引物 5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3^[13], 预扩增片段 310 bp。

(2) PCR 反应体系和条件

实时荧光 PCR 扩增体系: 反应体系 25 μL , premix Ex Taq 聚合酶 12.5 μL , TaqMan 探针 20 $\mu\text{mol/L}$ 各 1 μL (共 2 μL), 引物 20 $\mu\text{mol/L}$ 各 0.5 μL (共 2 μL), 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 补足至 25 μL 。 荧光 PCR 反应参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

常规 PCR 扩增体系和反应条件: 反应体系 50 μL , Taq 酶 0.25 μL , 10 \times PCR Buffer (含 Mg²⁺) 5 μL , dNTPs 4 μL , 上下引物各 1 μL (每种引物终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$), 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 补足至 50 μL 。 循环参数: 在 PCR 上预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 取 PCR 产物及核酸分子量参照物, 在 3% 琼脂糖凝胶上电泳。

2.4 特异性实验

取金黄色葡萄球菌 ATCC33591, 金黄色葡萄球菌 ATCC29213, 铜绿假单胞菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌分离株各 1 株根据 2.3.2 方法提取 DNA, 利用已建立的双色荧光 PCR 反应方法进行检测。

2.5 灵敏度实验

经平板菌落计数法测定的金黄色葡萄球菌 ATCC33591 培养液, 进行 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 梯度稀释, 从每个稀释度中取菌悬液, 根据

2.3.2 方法提取 DNA, 并进行双色荧光 PCR 检测。

2.6 双色荧光 PCR 稳定性实验结果

对金黄色葡萄球菌 ATCC33591、ATCC29213 分别进行二代、三代、四代、五代接种培养, 1~5 代菌经 DNA 提取后, 进行双色荧光 PCR 检测, 每代做两个平行实验。

2.7 实际样品双色荧光 PCR 检测

利用微生物自动鉴定及药敏系统, 纸片扩散法检测金黄色葡萄球菌(ATCC33591、ATCC29213)及 9 株金黄色葡萄球菌耐药性, 并提取菌株 DNA, 按双色荧光 PCR 反应方法进行检测。

2.8 双色荧光 PCR 结果判断

双色荧光 PCR 结果判定: 荧光 PCR 检测扩增曲线指数期明显, Ct<35 为阳性。其中以 Ct<35 且扩增曲线指数期明显可直接判定为阳性。Ct 值在 35~37 之间判断为可疑, 需要加大模板量进行重复实验, 如果指数期明显的扩增曲线方可判定为阳性, 否则为阴性。

常规 PCR 结果判定: 有符合预期长度且电泳条带明显者判定为阳性, 不符合预期长度或者条带不明显者判定为阴性。

3 结果与分析

3.1 双色荧光 PCR 特异性实验结果

以金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因与 *mecA* 基因为目的基因, 按双色荧光 PCR 反应体系进行 PCR 扩增, 在 FAM 通道下金黄色葡萄球菌 ATCC33591、ATCC29213 分别出现指数期明显的 *nuc* 基因扩增曲线, 而其他铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠杆菌 ATCC25922、沙门氏菌、副溶血性弧菌扩增曲线成直线(图 1)。在 HEX 通道下金黄色葡萄球菌 ATCC33591 出现指数期明显的 *mecA* 基因扩增曲线, 而金黄色葡萄球菌 ATCC29213、铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠杆菌 ATCC25922、沙门氏菌、副溶血性弧菌扩增曲线成直线(图 2)。

常规 PCR 结果, 金黄色葡萄球菌 ATCC33591、ATCC29213 出现与预期相符的扩增片段, 表明上述 2 株金黄色葡萄球菌均有 *nuc* 基因, 金黄色葡萄球菌 ATCC33591 有 *mecA* 基因, 结果与荧光 PCR 结果相同(图 3)。

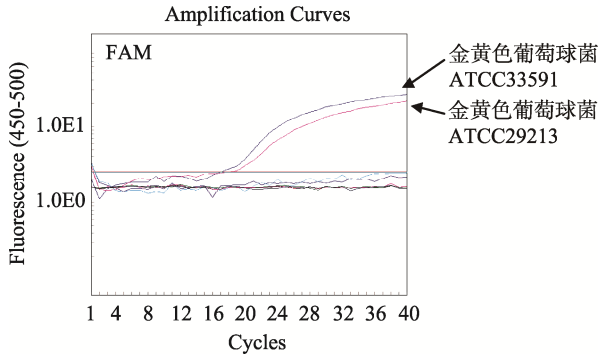


图 1 金黄色葡萄球菌(ATCC33591, ATCC29213)、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌 *nuc* 基因检测结果

Fig. 1 The detection results of *nuc* gene for *S.aureus* (ATCC33591, ATCC29213), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Vibrio parahemolyticus*

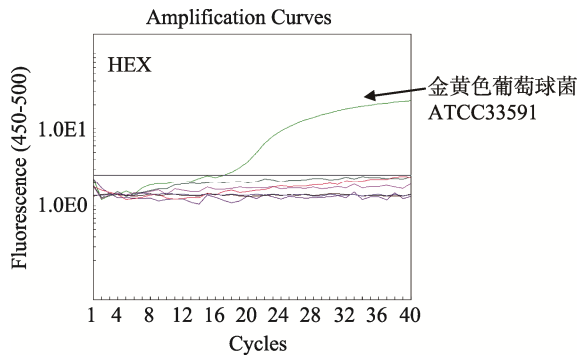


图 2 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌 *mecA* 基因检测结果

Fig. 2 The detection results of *nuc* gene for *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Salmonella* and *V.parahemolyticus*

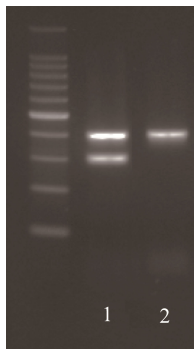


图 3 金黄色葡萄球菌(1.ATCC33591; 2.ATCC29213)*nuc*, *mecA* 基因 PCR-琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 3 The detection results of *nuc*, *mecA* gene for *S.aureus*(1.ATCC33591; 2.ATCC29213)by PCR-AGE(agarose gel electrophoresis)

3.2 双色荧光 PCR 灵敏度实验结果

经平板菌落计数法测定金黄色葡萄球菌 ATCC33591 培养液原始浓度为 2.7×10^8 CFU/mL, 梯度稀释后分别得到 2.7×10^7 、 2.7×10^6 、 2.7×10^5 、 2.7×10^4 、 2.7×10^3 、 2.7×10^2 、 2.7×10 CFU/mL 浓度的菌液, 利用已建立方法进行检测, 结果显示, 双色荧光 PCR 检测方法检测 MRSA 的最低检测下限为 2.7×10^3 CFU/mL(图 4、图 5)。

3.3 双色荧光 PCR 重复性实验结果

金黄色葡萄球菌 ATCC33591、ATCC29213 的 1~5 代菌经检测后, *nuc* 基因均检出, ATCC33591 五代均

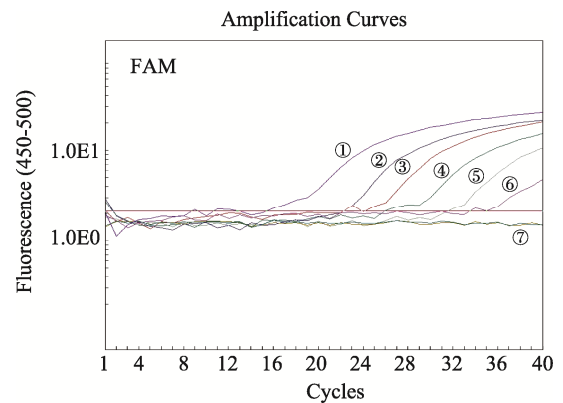


图 4 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因灵敏度检测结果

Fig. 4 The sensitivity test results of *nuc* gene for *S.aureus* 1. 2.7×10^8 CFU/mL 菌液; 2. 2.7×10^7 CFU/mL 菌液; 3. 2.7×10^6 CFU/mL 菌液; 4. 2.7×10^5 CFU/mL 菌液; 5. 2.7×10^4 CFU/mL 菌液; 6. 2.7×10^3 CFU/mL 菌液; 7. 2.7×10^2 , 2.7×10 CFU/mL, 阴性对照

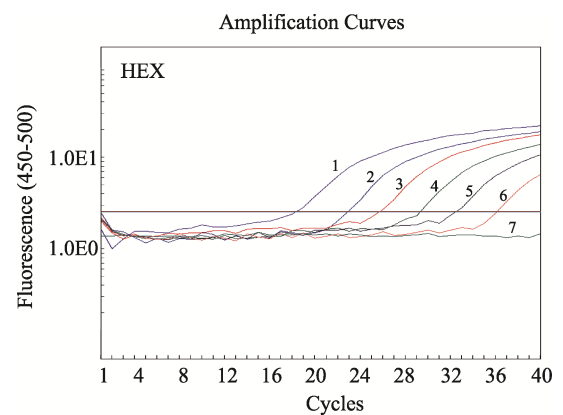


图 5 金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因灵敏度检测结果

Fig. 5 The sensitivity test results of *mecA* gene for *S.aureus* 1. 2.7×10^8 CFU/mL 菌液; 2. 2.7×10^7 CFU/mL 菌液; 3. 2.7×10^6 CFU/mL 菌液; 4. 2.7×10^5 CFU/mL 菌液; 5. 2.7×10^4 CFU/mL 菌液; 6. 2.7×10^3 CFU/mL 菌液; 7. 2.7×10^2 , 2.7×10 CFU/mL, 阴性对照

有 *mecA* 检出, 而 ATCC29213 五代均没有 *mecA* 检出 (图 6、图 7), 结果显示此方法具有良好的稳定性。

3.4 实际样品双色荧光 PCR 检测结果

金黄色葡萄球菌 9 株分离株利用全自动微生物鉴定及药敏系统和纸片扩散法检测其耐药性, 并利用本实验所建立的双色荧光 PCR 方法进行 PCR 检测。结果显示(图 8、图 9), 9 株金黄色葡萄球菌和 2 株标准菌株均有 *nuc* 基因检出, 金黄色葡萄球菌 ATCC33591 及 3 株分离株有 *mecA* 基因检出, 6 株未有 *mecA* 基因检出, 说明此 9 株分离菌株中, 有 3 株为 MRSA, 6 株为 MSSA, 这与全自动微生物鉴定及药敏系统、纸片扩散法的检测结果相同。

4 讨论

MRSA 产生耐药性的根本原因是编码 PBP2a 的

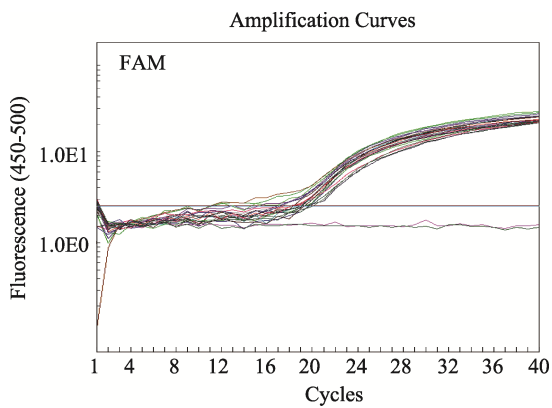


图 6 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因稳定性检测结果

Fig. 6 The stability test results of *nuc* gene for *S.aureus*

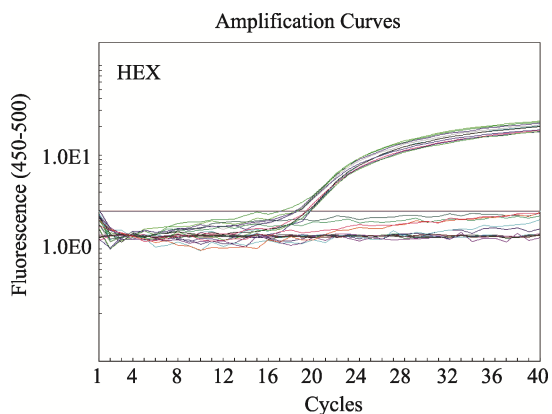


图 7 金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因检测重复 10 次结果

Fig. 7 The stability test results of *mecA* gene for *S.aureus*

mecA 基因, *mecA* 基因的检测被视为检测 MRSA 的“金标准”^[14,15], 本文针对此基因作为鉴定 MRSA 的目标基因, 设计标记有荧光基团 FAM 的 Taqman 探针。同时针对金黄色葡萄球菌的特异性菌属鉴定基因 *nuc*(耐热核酸酶)基因^[16], 设计标记有荧光基团 HEX 的 Taqman 探针, 经优化后建立起双色荧光 PCR 快速检测鉴定方法。利用已建立的方法同时检测目标菌株金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC33591、ATCC29213 及非目标菌株铜绿假单胞菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌, 结果显示目标菌株 MRSA 标准菌株 ATCC33591 在 FAM 和 HEX 通道均检测到荧光信号, 而 MSSA 标准菌株 ATCC29213 仅在 FAM 通道检测到荧光信号, 说明该检测方法具有良好的特异性; 对

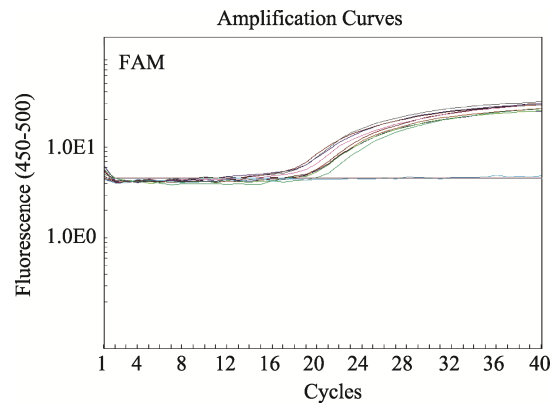


图 8 金黄色葡萄球菌标准株及 9 株分离株 *nuc* 基因检测结果

Fig. 8 Detection result of *nuc* gene for reference strain and 9 isolates of *S.aureus*

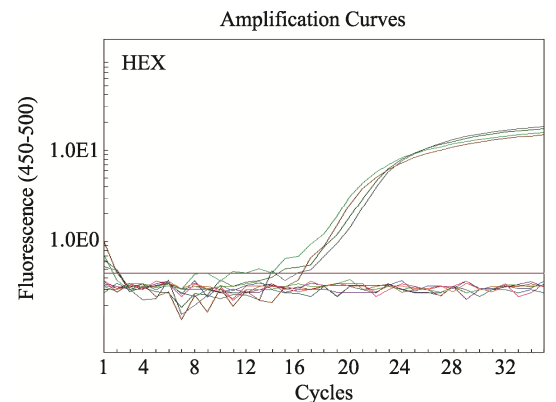


图 9 金黄色葡萄球菌标准株及 9 株分离株 *mecA* 基因检测结果

Fig. 9 Detection result of *mecA* gene for reference strain and 9 isolates of *S.aureus*

梯度稀释的金黄色葡萄球菌 ATCC33591 检测结果表明, 该方法的检测下限是 2.7×10^3 CFU/mL; 对金黄色葡萄球菌 ATCC33591、ATCC29213 分别接种至第五代, 五代均检测到荧光信号, 且 C_t 值相近, 说明本方法具有良好的稳定性。此外, 对实际样品分离株检测结果与纸片扩散法, 全自动微生物鉴定及药敏系统的鉴定结果一致, 说明本方法具有良好的实用性及可行性。

本研究应用双色荧光 PCR 法同时检测两种基因, 在同一体系内即可完成一株菌的鉴定, 可提高检测效率及通量, 另外, 双色荧光 PCR 法无扩增后处理, 避免了后续处理可能造成的污染, 检测过程仅需 1 个小时左右, 缩短了检测周期, 适于出入境检验检疫中快速准确的要求。

参考文献

- [1] 黄冰, 邓志爱, 谭铭雄, 等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况、产肠毒素特性及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 9(6): 1380-1382.
Huang B, Deng ZA, Tan MX, et al. Contamination status, staphylococcal enterotoxin-producing property and drug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from food products [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 9(6): 1380-1382.
- [2] 李虹玲, 傅锦芳, 周辉, 等. 荧光实时 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[C]. 2012 年中华医学会全国临床微生物学学术交流大会.
Li HL, Fu JF, Zhou H, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Real-Time fluorescence PCR [C]. In 2012 national clinical microbiology academic exchange conference of the Chinese medical association.
- [3] 王登峰, 段新华, 吴建勇, 等. 牛源金黄色葡萄球菌耐药性及甲氧西林敏感和耐甲氧西林菌株演化相关性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1416-1425.
Wang DF, Duan XH, Wu JY, et al. The current status of the drug resistance and evolutionary relationship of MSSA and MRSA isolates from bovine of China [J]. Acta Veter Zootech Sinica, 2011, 42(10): 1416-1425.
- [4] 王雪敏, 姚建楠, 李蓓蓓, 等. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药表型及其 SCCmec 基因分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(9): 841-845.
Wang XM, Yao JN, Li BB, et al. Antimicrobial susceptibility and SCCmec typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from swine [J]. Chin J Zoonose, 2013, 29(9): 841-845.
- [5] 邓波, 吕媛. Mohnarin2009 年度报告: 革兰阳性菌耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(5): 335-339.
Deng B, Lv Y. Mohnarin 2009 report: Antimicrobial resistance surveillance of gram-positive cocci [J]. Chin J Clin Pharm, 2011, 27(5): 335-339.
- [6] SN/T1944-2007 动物及其制品中细菌耐药性的测定-纸片扩散法[S].
SN/T1944-2007 Detection of antimicrobial resistance of the bacteria in animal and animal products--Disk diffusion testing [S].
- [7] M100-S21 performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement [S].
- [8] 弓艳娥. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性检测和同源性分析[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
Gong YE. MRSA, resistance, and study of molecular epidemiology in *Staphylococcus aureus* [D]. Changsha: Central South University, 2011.
- [9] 郭云龙, 赵先进, 韩宏艳, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药表型分型与耐药基因检测分析研究[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(1): 32-35.
Guo YL, Zhao XJ, Han HY, et al. Antibiotic resistance phenotype and gene detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin Remed Clin, 2012, 12(1): 32-35.
- [10] GB 4789.10-2010 食品微生物学检验-金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [11] Thomas LC, Gidding HF, Ginn AN, et al. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture [J]. J Microbiol Method, 2007, 68: 296-302.
- [12] Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products[J]. Mol Cell Prob, 2005, 19: 299-305.
- [13] Wang X, Meng JH, Zhang J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 153: 142-147.
- [14] Shore AC, Deasy EC, Slickers P, et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type X I carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR*, *blaz*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agent Che, 2011, 55(8): 3765-3773.
- [15] Kumar SM, Heistraeten LV, Lee A, et al. Evaluation of molecular assays for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4598-4601.
- [16] Kovacevic S, Veal LE, Hsiung H M, et al. Secretion of staphylococcal nuclease by bacillus subtilis [J]. J Bacteriol, 1985, 162(2): 521-528.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。
E-mail: zhengqiyue@163.com