

国标培养法与2种金黄色葡萄球菌快速筛检方法的比较

王利刚, 张磊, 张婧, 费云滢, 付莎莉, 吴丹, 屠大伟*

(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

摘要: **目的** 将 mini-VIDAS 法和膜芯片 2 种快速筛检方法与国标培养法进行比较, 评估 2 种快速筛检方法的效果和可操作性。**方法** 以金黄色葡萄球菌为目标菌, 针对 3 种筛检方法设计灵敏性、特异性、抗干扰性实验和人工污染实验, 通过比较获得 3 种筛检方法的应用效果情况。**结果** 国标培养法和 mini-VIDAS 法的灵敏性较好, mini-VIDAS 法和膜芯片法的特异性和抗干扰性较好, 人工污染实验中 3 种方法的结果均符合设计预期。**结论** 日常检验中可采用国标培养法和 mini-VIDAS 法进行筛检工作, 应急任务可使用膜芯片法, 以缩短筛检时间, mini-VIDAS 法和膜芯片法是金黄色葡萄球菌快速筛检的可靠工具。

关键词: 金黄色葡萄球菌; mini-VIDAS 法; 膜芯片法; 快速筛检

Comparison of traditional culture method and 2 rapid screening methods for detection of *Staphylococcus aureus*

WANG Li-Gang, ZHANG Lei, ZHANG Jing, FEI Yun-Yan, FU Sha-Li, WU Dan, TU Da-Wei*

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT: Objective To compare 2 rapid screening methods of mini-VIDAS method and membrane chip method with the culture method in national standard, evaluating the effectiveness and feasibility of the 2 methods. **Methods** *Staphylococcus aureus* was selected as target bacteria, the experiments were designed to test the sensitivity, specificity and interference resistance of 3 methods, and the artificially contaminated samples were tested simultaneously. The application effects of 3 screening methods were compared. **Results** The culture method in national standard and mini-VIDAS method had a high sensitivity, the specificity and interference resistance of mini-VIDAS and membrane chip method were better, and the results of 3 methods in artificially contaminate test were consistent with the design expectation. **Conclusion** The culture method in national standard and mini-VIDAS method can be used in daily inspections, and membrane chip method can be used in emergency testing in order to shorten the screening time. Additionally, the mini-VIDAS method and membrane chip method are reliable tools for rapid screening of *Staphylococcus aureus*.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; mini-VIDAS method; membrane chip method; rapid screening

基金项目: 重庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2015shmszx00002)

Fund: Supported by the Social Science and Technology Innovation Project of Chongqing (cstc2015shmszx00002)

*通讯作者: 屠大伟, 正高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: weidatufu@163.com

*Corresponding author: TU Da-Wei, Senior Engineer, Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China. E-mail: weidatufu@163.com

1 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种食品中常见的食源性致病菌,广泛存在于自然界中,在其生长过程中会产生不同种类的毒素和侵袭性酶,如肠毒素、杀白细胞素、溶血毒素和血浆凝固酶等,食用了被其污染的食品后可能导致人体出现食物中毒,如严重腹泻等症状,严重威胁健康和生命安全^[1-5]。因此,研究金黄色葡萄球菌的检测方法对提高食品安全检验技术、保障公众生命健康具有重要意义。

根据我国食品中致病菌的限量标准规定,金黄色葡萄球菌要求为五样法检验^[6],而金黄色葡萄球菌的国家标准检验方法采用的是传统培养方法^[7],操作步骤繁多,从处理样品到初步筛检结果通常需要 36~72 h,因此,传统的培养方法已经不能满足检验工作中通量大、时限短的要求,迫切需要快速、简便、可靠的筛检技术。随着对金黄色葡萄球菌生长特性研究的深入和生物技术的发展,免疫学及分子生物学检验技术逐步建立并应用到检验中,部分成熟可靠的技术已经商业化^[8-12]。本研究将国家标准中的传统培养方法^[7]、已商业化的基于免疫学方法的金黄色葡萄球菌筛检试剂条^[13]和正在开发的基于分子生物学方法的膜芯片 3 种筛检方法进行对比试验,对方法的灵敏性、特异性和抗干扰性进行比较,并观察不同方法在人工污染试验下的筛检效果。

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 菌株与样品

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, CICC 23656)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, CICC 10294)来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心;鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC®14028™)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC®19115™)、阪崎氏肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*, ATCC®25944™)和大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC®25922™)来源于美国菌种保藏中心。

人工污染试验使用的样品为实验室日常检验样品,共 50 批次,均已确定为金黄色葡萄球菌阴性样品。其中肉制品 10 批次、蛋及蛋制品 10 批次、蔬菜制品 10 批次、生鲜乳 10 批次、冷冻肉制品 10 批次。

2.1.2 仪器与试剂

ZDP-2160 常规生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司); mini-VIDAS 全自动免疫分析仪(美国 bioMérieux, Inc.); MFS-8 膜芯片杂交仪(四川华汉三创生物科技有限公司); IMG-1 膜芯片成像仪(四川华汉三创生物科技有限公司)。

7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker 培养基、血平板、BHI 肉汤、营养琼脂、兔血浆冻干粉(北京陆桥技术股份有限公司); VIDAS SET2 试剂条(法国 bioMérieux, SA 公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司); 致病微生物检测芯片(四川华汉三创生物科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 实验步骤

国标方法:按照 GB 4789.10^[7]中的检验流程,将样品转接至 Baird-Parker 培养基,36 °C 培养 24 h,观察筛检结果。

mini-VIDAS 法:按照使用说明书进行增菌、提取等操作,上机检验结束后,生成仪器报告并打印筛检结果。

膜芯片法:接种产品自带培养基,并按照其要求的培养温度、时间培养后,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA,使用自带的 PCR Mix 对提取的 DNA 进行扩增,扩增产物 99 °C 变性 10 min,用膜芯片杂交仪进行杂交、洗脱等操作,结束后使用膜芯片成像仪观察筛检结果。

2.2.2 灵敏性试验

本研究对 3 种筛检方法的灵敏度进行比较,将金黄色葡萄球菌标准菌株接种到营养肉汤中,36 °C 培养 24 h,按照 1:10 的比例进行梯度稀释,获得 $10^1\sim 10^4$ CFU/mL 浓度的菌悬液,不同浓度视作不同方法液体培养基培养物,分别按照 2.2.1 进行筛检操作。

2.2.3 特异性试验

本研究对 3 种筛检方法的特异性进行比较,对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、阪崎氏肠杆菌、大肠埃希氏菌和表皮葡萄球菌进行培养,培养物按照 1:10 的比例进行梯度稀释,获得 10^3 CFU/mL 浓度的菌悬液,分别按照 2.2.1 进行筛检操作。

2.2.4 杂菌干扰试验

本研究对存在杂菌干扰时的 3 种筛检方法的筛检效果进行比较,将金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、阪崎氏肠杆菌、大肠埃希氏菌和表皮葡萄球菌分别进行培养,按照 1:10 的比例进行梯度稀释,以金黄色葡萄球菌为目标,设定 3 组混合菌。第 1 组为鼠伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、阪崎氏肠杆菌、大肠埃希氏菌和表皮葡萄球菌,浓度均为 10^1 CFU/mL,按照体积比为 1:1:1:1:1 混合;第 2 组混合菌中上述 5 种菌的浓度均为 10^2 CFU/mL,按照体积比为 1:1:1:1:1 混合;第 3 组混合菌中上述 5 种菌的浓度均为 10^3 CFU/mL,按照体积比 1:1:1:1:1 混合。以上混合菌按照 1:1(V:V)的比例与浓度为 10^2 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌混合,同时使用浓度为 10^3 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌和浓度为 10^3 CFU/mL 的混合菌作为阳性和阴性对照,分别按照 2.2.1 进行筛检操作。

2.2.5 人工污染试验

模拟日常检验条件,对 3 种筛检方法的筛检效果进行比较,收集实验室检验的金黄色葡萄球菌阴性样品 50 批次,

其中肉制品 10 批次、蛋及蛋制品 10 批次、蔬菜制品 10 批次、生鲜乳 10 批次、冷冻肉制品 10 批次。将每批次样品分为 2 组, 一组为阳性对照组, 按照每 25 g 样品添加 1 mL 浓度为 10^2 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌的比例进行人工污染; 另一组为阴性对照组, 不进行人工污染, 分别按照 2.2.1 进行筛检操作。

3 结果与分析

3.1 灵敏性实验

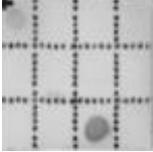
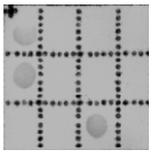
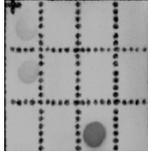
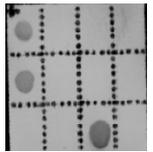
用 3 种方法对不同浓度的金黄色葡萄球菌菌悬液进行灵敏性试验的结果如表 1 所示, 在传统国标培养法中, Baird-Parker 培养基上出现典型菌落的浓度(即检出浓度)为 10^1 CFU/mL; mini-VIDAS 法出现判定为阳性结果的浓度为 10^1 CFU/mL, 灵敏性较高, 当检测阈值(test value, TV)大于 0.13 时, 系统判定检出金黄色葡萄球菌; 膜芯片法的检出浓度为 10^2 CFU/mL, 膜芯片法通过核酸杂交显色后观察结果是否呈阳性, 但在杂交前还经过了 DNA 提取、PCR 扩增及高温变形等过程^[14], 每一步操作都会对结果造成影响,

故其灵敏性除方法本身外还应考虑实验人员的操作情况。由实验结果可以看出, 国标培养法和 mini-VIDAS 法的灵敏性高于膜芯片法。

3.2 特异性实验

3 种方法的特异性实验结果如表 2 所示, 国标培养法中 Baird-Parker 培养基的选择性较强, 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 培养基上的典型生长状态为: 菌落直径为 2~3 mm, 颜色呈灰色到黑色, 边缘为淡色, 周围为一混浊带, 在其外层有一透明圈^[7]。其他菌一般不会生长或与金黄色葡萄球菌的典型形态差异较大, 肉眼观察容易区分, 可直接排除。表皮葡萄球菌在 Baird-Parker 培养基上的生长状态与金黄色葡萄球菌相似, 但没有浑浊圈, 也可以直接分辨。但有报道称, Baird-Parker 培养基可能会因为配制、保存等原因, 使金黄色葡萄球菌生长时出现生长状态不典型的情况^[15]。mini-VIDAS 法针对金黄色葡萄球菌产生的肠毒素进行检验, 特异性较强。膜芯片法针对金黄色葡萄球菌的 *spa* 基因^[16]设计探针, 特异性较好, 其特异性与 mini-VIDAS 法相当。

表 1 3 种检测方法的灵敏性比较
Table 1 Comparison of sensitivity of 3 methods

菌悬液浓度(CFU/mL)		10^1	10^2	10^3	10^4
国标培养法	现象描述	无可疑菌落生长	可疑菌落生长	可疑菌落生长	可疑菌落生长
	判定结果	+	+	+	+
Mini-VIDAS 法	TV 值	0.20	0.73	1.24	2.89
	判定结果	+	+	+	+
膜芯片法	芯片成像图片*				
	判定结果	-	-	+	+

注: *

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

 1 表示细菌通用内参基因; 5 表示金黄色葡萄球菌; 11 表示杂交阳性质控; 12 表示杂交阴性质控。

表 2 3 种检测方法的特异性比较
Table 2 Comparison of specificity of 3 methods

	金黄色葡萄球菌	鼠伤寒沙门氏菌	单增李斯特氏菌	阪崎氏肠杆菌	大肠埃希氏菌	表皮葡萄球菌
国标培养法	+	-	-	-	-	-
mini-VIDAS 法	+	-	-	-	-	-
膜芯片法	+	-	-	-	-	-

3.3 杂菌干扰实验

杂菌干扰实验结果如表 3 所示, 按照 2.4 的设计, 干扰菌的总浓度水平为 10^1 CFU/mL、 10^2 CFU/mL 及 10^3 CFU/mL, 分别处于低于、相当、高于金黄色葡萄球菌的浓度水平, 本试验的结果可反应 3 种筛检方法在以上 3 种干扰浓度下的筛检效果情况。阳性对照组和阴性对照组的实验结果显示, 3 种方法的操作正常, 采用国标培养法时, 在杂菌干扰实验的 3 个设计中均有典型菌落生长, 但由于其中有其他干扰菌的存在, 出现菌落之间交叉、覆盖的现象, 不利于典型菌落的观察, 可以再次挑菌纯化后观察, 其他研究者也有类似情况出现^[17]。Mini-VIDAS 法的筛检结果均为阳性, 阴性对照组的检测结果为阴性, 杂菌干扰实验结果与预期完全符合。膜芯片法在干扰菌浓度低或者相当时检出, 干扰菌浓度高时未检出, 原因可能是 DNA 提取后总 DNA 浓度不变, 但是目标菌的 DNA 浓度相对较低, 从而影响判定结果。

表 3 3 种检测方法的抗干扰性比较
Table 3 Comparison of anti-interference of 3 methods

	干扰菌总浓度(CFU/mL)			阳性 对照 样品	阴性 对照 样品
	10^1	10^2	10^3		
国标培养法	+/-	+/-	+/-	+	+/-
mini-VIDAS 法	+	+	+	+	-
膜芯片法	+	+	-	+	-

3.4 人工污染实验

人工污染实验结果见表 4, 国标培养法对于阳性组样品的筛检效率为 90%, 有 10% 的样品出现疑似典型菌落的情况, 进一步实验证明其为非金黄色葡萄球菌, 阴性组样品中也有相同情况出现。mini-VIDAS 法对于阳性组样品的筛检效率为 100%, 对阴性组样品的筛检效率为 80%, 其中有 20% 的样品被鉴定为阳性, 可能的原因是这类样品在原料或者生产过程中存在金黄色葡萄球菌生长的情况, 并且产生了肠毒素, 肠毒素具有耐热等特性^[18], mini-VIDAS 法针对的是金黄色葡萄球菌的肠毒素进行检

表 4 人工污染样品的筛检结果比较

Table 4 Comparison of the pre-detection for artificially contaminated samples

筛检情况	阳性组筛检效率(%)			阴性组筛检效率(%)		
	+	-	+/-	+	-	+/-
国标培养法	90	0	10	0	82	18
mini-VIDAS 法	100	0	/	20	80	/
膜芯片法	100	0	/	0	100	/

验, 因此会出现以上情况。膜芯片法对于阳性组样品的筛检效率为 100%, 但是阳性结果观察到的显色程度不同, 个别样品显色较浅, 这可能是由于干扰菌较多, 增菌过程中金黄色葡萄球菌未形成优势菌株, 从而造成后期显色不明显, 符合预期。

4 结 论

从 3 种筛检方法的比较结果可以看出, 传统国标培养法的灵敏性、特异性较优, 但在杂菌较多的情况下进行菌落形态观察时容易被干扰; mini-VIDAS 法在特异性、灵敏性和抗干扰性上均表现良好, 可以满足日常筛检工作需要, 而且可以直接判定样品中是否存在肠毒素, 获得样品的安全风险情况的进一步信息; 膜芯片法的特异性较好, 但是该方法要从菌株水平转换到分子水平, 中间步骤会影响其灵敏性, 甚至可能出现假阴性结果。实际操作中 3 种方法的筛检时间差异较大, 国标培养法为 36~72 h, mini-VIDAS 法为 90 min 或者 24 h, 膜芯片法为 14 h。综合以上情况, 建议日常检验中可以采用国标培养法和 mini-VIDAS 法进行筛检工作, 对于应急任务可使用膜芯片法缩短筛检时间, 同时用 mini-VIDAS 法进行验证, 确保实验结果的准确性。

参考文献

- [1] 周莉, 王永, 王法云, 等. 食品中金黄色葡萄球菌概况及新型检测技术研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(2): 1-4.
Zhou L, Wang Y, Wang FY, et al. Recent advance of general situation and novel detection technologies of *Staphylococcus aureus* in food [J]. China Brew, 2016, 35(2): 1-4.
- [2] 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 等. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 555-560.
Zhang QQ, Fan YL, Song MH, et al. Research advances on foodborne *Staphylococcal* enterotoxins and its detection methods [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 555-560.
- [3] Necidova L, Bogdanovicova K, Harustiakova D, et al. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxin A, B, and C in milk [J]. J Dairy Sci, 2016, 99(11): 8638-8643.
- [4] Cheng K, Wang S, Xu Y. Different roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in different subtypes of nasal polyps [J]. Exp Therapeutic Med, 2017, (13): 321-326.
- [5] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 392-395.
Li Y. Research advances on foodborne staphylococcal enterotoxins and its detection methods [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, 14(4): 392-395.
- [6] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S].
GB 29921-2013 National food safety standard Pathogen limits for food [S].
- [7] GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 金黄色葡萄球菌检验[S].
GB 4789.10-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- [8] 李丹丹, 徐义刚, 邱索平, 等. 金黄色葡萄球菌实时荧光 PCR 快速检测方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(3): 198-201.

- Li DD, Xu YG, Qiu SP, *et al.* Development of a dual real-time PCR method for rapid detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(3): 198–201.
- [9] 朱安妮, 唐俊妮, 赵燕英, 等. 金黄色葡萄球菌新型肠毒素 I 双抗夹心-酶联免疫检测方法的建立[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 193–198.
- Zhu AN, Tang JN, Zhao YY, *et al.* Development of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin I (SEI) [J]. Food Sci, 2016, 37(16): 193–198.
- [10] 李琴, 王莹, 柳家鹏, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国奶牛, 2016, (3): 32–35.
- Li Q, Wang Y, Liu JP, *et al.* Developing a detection method for staphylococcal enterotoxin a & b by enzyme-linked immuno-sorbent assay [J]. China Dairy Cattle, 2016, (3): 32–35.
- [11] 赵玥明, 满朝新, 曲艳艳, 等. 环介导等温扩增技术快速检测肉中金黄色葡萄球菌[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(1): 57–61.
- Zhao YM, Man ZX, Qu YY, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in raw meat samples by loop-mediated isothermal amplification [J]. Food Nutr China, 2016, 22(1): 57–61.
- [12] 周莉, 王永, 王法云等. 免疫磁珠检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 河南科学, 2015, (7): 1119–1123.
- Zhou L, Wang Y, Wang FY, *et al.* Immune magnetic beads(IMB) detecting *Staphylococcus aureus* in food [J]. Henan Sci, 2015, (7): 1119–1123.
- [13] 薛成玉, 遇晓杰, 万丽葵, 等. 全自动荧光酶标仪测定金黄色葡萄球菌肠毒素的研究[J]. 中国卫生工程学, 2008, 7(5): 305–306.
- Xue CY, Yu XJ, Wan LK, *et al.* Determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin by mini VIDAS detector [J]. Chin J Public Health Eng, 2008, 7(5): 305–306.
- [14] 何洋. 应用基因芯片检测食品中金黄色葡萄球菌[D]. 成都: 西华大学, 2006.
- He Y. Applying gene chip for detecting *Staphylococcus aureus* in foods [D]. Chengdu: Xihua University, 2006.
- [15] 张文利, 刘月芳. BP 培养基经不同条件贮存后对金黄色葡萄球菌检测结果的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 620–620, 634.
- Zhang WL, Liu YF. Effect of baird-parker medium on the detection results of *Staphylococcus aureus* after storage in different conditions [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(5): 620–620, 634.
- [16] 李荷楠, 赵春江, 陈宏斌, 等. ST239-spa t037 MRSA 与 ST239-spa t030 MRSA 的比较基因组分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(9): 770–773.
- Li HN, Zhao CJ, Chen HB, *et al.* Comparative genomic analysis of ST239-spa t037 MRSA and ST239-spa t030 MRSA [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2012, 32(9): 770–773.
- [17] 林碧莲. 不同金黄色葡萄球菌选择性分离平板效果比较及探讨[J]. 福建轻纺, 2016, (7): 40–42.
- Lin BL. Comparison and discussion on the effect of selective separation plate of *Staphylococcus aureus* [J]. Light Textile Ind Fujian, 2016, (7): 40–42.
- [18] 陈道利, 高峥, 霍开兰, 等. 凝固酶及核酸酶试验综合评价金黄色葡萄球菌致病力的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(3): 257–258.
- Chen DL, Gao Z, Huo KL, *et al.* Coagulase and nucleinase tests general evaluation trial study of *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Health Lab Technol, 2001, 11(3): 257–258.

(责任编辑: 刘 丹)

作者简介



王利刚, 工程师, 主要研究方向为食品安全、食源性致病菌检验。
E-mail: wanglg1985@sina.com



屠大伟, 正高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: weidatufu@163.com