

金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法及前处理技术研究进展

林梅英^{1,2,3}, 宋明辉³, 杨美成³, 秦峰^{2,3*}

(1. 复旦大学药学院, 上海 201203; 2. 中国医药工业研究总院, 上海 201203;
3. 上海市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 上海 201203)

摘 要: 金黄色葡萄球菌是常见的食源性致病菌之一, 肠毒素是导致金黄色葡萄球菌污染食物中毒的最主要原因。现有肠毒素检测方法包括免疫学方法、分子生物学方法、生物传感器方法和质谱法等。各方法均存在优劣, 酶联免疫法作为现有国家、行业标准推荐方法, 虽然灵敏度高, 但存在交叉反应, 且价格昂贵。质谱分析技术具有高通量、专属性强等优点, 已成为近年肠毒素检测技术研究热点。由于食品基质含有脂质、糖类等多种复杂成分, 对肠毒素的分离与检测具有较强的干扰, 因此选择恰当的样品前处理方法是实现肠毒素准确检测的关键。本文分别从肠毒素性质、肠毒素检测方法、样品前处理等方面对现有研究进展进行阐述。通过对现有技术方法的比较分析, 基于高效液相分离技术结合质谱检测技术开发肠毒素检测方法, 不仅能够从食品中实现多种肠毒素的高效分离富集, 还具有灵敏度高、专属性强等优点, 有望成为肠毒素检测方法的主要研究方向。

关键词: 食源性中毒; 肠毒素; 检测方法; 质谱; 样品前处理

Research progress on detection methods and pretreatment technology of staphylococcal enterotoxins

LIN Mei-Ying^{1,2,3}, SONG Ming-Hui³, YANG Mei-Cheng³, QIN Feng^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China; 2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is one of the common foodborne pathogens. Enterotoxin is the main cause of food poisoning caused by *Staphylococcus aureus*. The existing detection methods of enterotoxin include immunological methods, molecular biology methods, biosensor methods and mass spectrometry, etc. Each method has its own advantages and disadvantages. As an existing national and industrial standard recommended method, enzyme-linked immunosorbent assay has high sensitivity, cross reaction and high price. Mass spectrometry has become a research hotspot of enterotoxin detection technology in recent years because of its high throughput and strong specificity. Because the food matrix contains many complex components such as lipids and sugars, it has a strong interference to the separation and detection of enterotoxin. Therefore, the selection of appropriate sample

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603900)

*通信作者: 秦峰, 博士, 主任药师, 主要研究方向为食品药品微生物检验技术、痕量物质分析与实验室质量管理。Email: sifdcqinf@163.com

*Corresponding author: QIN Feng, Ph.D, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500, Zhangheng Road, Pudong District, Shanghai 201203, China. E-mail: sifdcqinf@163.com

pretreatment method is the key to realize the accurate detection of enterotoxin. This paper expounded the existing research progress from the aspects of enterotoxin properties, enterotoxin detection methods and principles, sample pretreatment methods and so on. Through the comparative analysis of existing technical methods, the development of enterotoxin detection method based on high performance liquid separation technology combined with mass spectrometry detection technology could not only realize the efficient separation and enrichment of a variety of enterotoxins from food, but also had the advantages of high sensitivity and strong specificity. It was expected to become the main research direction of enterotoxin detection methods.

KEY WORDS: food-borne poisoning; enterotoxins; detection method; mass spectrometry; sample preparation

0 引言

金黄色葡萄球菌是世界上最常见的细菌性疾病病原体之一,存在于一系列宿主中。金黄色葡萄球菌可分泌胞外蛋白、超抗原(super antigen, SAg),产生各种毒素介导的疾病,如脓疱病、食物中毒、烫伤皮肤综合征和中毒性休克综合征^[1]。其中肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)与金黄色葡萄球菌食物中毒(staphylococcal food poisoning, SFP)密切相关,由经典肠毒素 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 引起的 SFP 高达 95%^[2]。肠毒素中毒剂量低,摄入 100 ng 的肠毒素就会导致 SFP^[3],表现症状为恶心和剧烈呕吐,并伴有水样腹泻、虚弱和中度发热。症状通常在 24 h 内消退,但对于儿童和老年人可能是致命的,病死率高达 4.4%^[4]。SFP 在全球范围内影响广泛,美国疾病控制中心每年总计约 24 万例 SFP 病例^[5],我国 SFP 事件也时有发生^[6]。

鉴于肠毒素的危害性,研究人员已开发多种检测方法。近年来,随着质谱技术在蛋白质组学的不断深入研究,肠毒素的质谱学方法得到广泛应用,其中样品前处理是分析方法的关键步骤。因此,本文简要介绍肠毒素的性质,综合比较多种检测方法的优劣,并着重阐述相关样品前处理技术,为今后肠毒素的检测方法开发提供借鉴作用。

1 肠毒素的性质与表达

肠毒素是一类具有超抗原活性,分子量约为 26~30 kDa 的蛋白质^[7]。肠毒素对高温及酸碱环境具有良好的稳定性,并且对胃肠道多种消化酶表现抗性^[8]。这些毒素能选择性地激活 T 细胞,同时与 T 细胞受体 β 链上的 V_{β} 区和抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex class II, MHC II)类分子交联,释放大量的细胞因子引起中毒性休克^[9]。在过去的几十年中,基于它们抗原性的差异,人们已经认识到 5 种主要的经典肠毒素(SEA~SEE)^[10]。经典肠毒素是引起金黄色葡萄球菌食物中毒的主要类型,其中又以 SEA 最为常见,约占食物中毒事件的 70%^[11]。2000 年后,研究人员不断发现新型肠

毒素,基于它们与经典肠毒素的序列相似性,将其分为 2 大类:能够引起灵长类动物呕吐的归为肠毒素(SEs),不能引起灵长类动物呕吐的称为类肠毒素(staphylococcal enterotoxin-like toxins, SE/s)^[12]。迄今,已经鉴定了 24 种不同的 SEs 和 SE/s^[13]。

编码 SEs 和 SE/s 的基因主要位于金黄色葡萄球菌可移动遗传元件上,包括质粒、前噬菌体、致病岛等,并由多个调控元件和 DNA 结合蛋白协调^[14]。肠毒素蛋白的表达不仅由基因元件调控,并且受环境因素影响,如 pH、温度、氧气、碳源、盐等对毒力基因的转录均有一定影响^[13,15]。由于遗传学的多样性与复杂性,不同类型肠毒素的产毒机制及调控方式目前尚未有明确的结论,有待进一步研究。

2 肠毒素检测方法

2.1 检测方法比较

过去几十年至今,已有大量基于不同原理、灵敏度及选择性的肠毒素检测方法,包括生物学方法^[16]、免疫学检测^[17-18]、分子生物学方法^[19]、生物传感器方法^[20]、质谱方法^[21]等,已见相关综述文献报道^[3,22-24]。肠毒素传统的检测方法为动物实验法,因实验动物不易获得性,存在伦理问题,已被逐渐淘汰。血清学实验为早期检测肠毒素的方法,包括凝胶扩散实验和凝集实验,开发的反向被动胶乳凝集(reversed passive latex agglutination, RPLA)检测试剂盒,由于缺乏特异性,未被广泛应用。

酶联免疫法是目前应用最为广泛的免疫学检测方法,GB 4789.10—2016《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》中采用酶联免疫吸附实验法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测肠毒素,国际标准 ISO 19020:2017 采用酶联免疫荧光法(enzyme linked fluorescent immunoassay, ELFA)进行检测。商业化的葡萄球菌肠毒素免疫试剂盒可检测的种类仅为经典肠毒素(SEA~SEE),研究表明新型肠毒素同样与食品中毒事件紧密相关^[25]。酶联免疫方法存在一定的缺陷,由于天然抗体的生产过程复杂、耗时长、半衰期短、在高温和极端 pH 条件下易变性失活,导致检测成本昂贵。试剂盒多采用多

克隆抗体, 不同的肠毒素之间同源性高, 容易产生交叉反应, 导致结果假阳性假阴性率高。

分子生物学方法从基因水平鉴定肠毒素, 难以证明肠毒素蛋白的表达, 不能作为最终的检测手段。生物传感器方法由于缺乏通用性, 对于实际样品的应用较少。综上, 各检测方法均存在优劣之分, 如表 1, 其中质谱分析技术因具有特异性强、准确性高、可实现高通量检测的优势被认为是最具有前景的方法。

2.2 质谱检测方法

随着质谱仪器的不断发展, 质谱技术在蛋白质组学的应用越来越广泛, 尤其是液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)的最新发展极大地促进了生物医学的研究发展^[26]。LC-MS 对于复杂生物或非生物基质中蛋白质的表征、鉴定、确认和定量的重要性日益凸显^[27]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)对于生物大分子的鉴定发挥着不可替代的作用, 具有高通量、分辨率高、速度快、耗时短等突出优势, 往往只需几分钟就能得到结果^[28]。因此, 研究人员开始将肠毒素的检测与质谱技术相结合, 通常采用样品添加肠毒素标准品(纯度 > 95%, 美国 Toxin Technology 公司)的形式, 实现对肠毒素的定性定量检测。

肠毒素质谱检测方法相较于酶联免疫方法, 具有准确性高、耗时短、高通量等优势。质谱检测的灵敏度与准确性主要取决于样品的制备, 而实际样品中肠毒素含量低, 需要通过有效的分离富集得以检测。食物中含有大量的蛋白质, 碳水化合物和其他生物分子, 大多数会产生电荷竞争抑制效应, 干扰目标毒素的检测, 造成定性定量结果不准确, 因此样品前处理是质谱分析的关键步骤。

3 样品前处理方法

3.1 透析与蛋白沉淀法

欧洲官方筛查方法(European official screening methods, ESM)^[29]中对于食品基质采用透析方法进行毒素提取, 例如 SOSPEDR 等^[30]采用透析法从果汁中纯化肠毒素。ANDJELKOVIC 等^[31]按照 ESM 方法对肠毒素进行提取浓缩, 并开发了一种在线固相萃取(solid phase extraction, SPE)结合 LC-MS/MS 检测牛奶中的 SEA 和 SEB, 但整个过程耗时长。MEYRAND 等^[32]比较了透析浓缩法和三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)沉淀法 2 种肠毒素提取方法, 发现 TCA 沉淀法优于透析浓缩法, 结果无假阴性, 且速度较快, 仅需 1 h, 而透析浓缩法所需时间为 18~24 h。因此, TCA 沉淀法是一种方便、廉价、可靠的提取方法, 可替代透析法用于乳制品安全性评价并适用于肠毒素大规模提取。BAO 等^[33]采用 TCA 沉淀法, 对加标的鸡肉样品进行处理, 进一步酶解后的多肽混合物通过 LC-MS 分析, 成功鉴定了 SEB 的 9 个蛋白水解片段, 总序列覆盖率为 35%, 该方法的回收率在 69%~103%。KOIKE 等^[34]将 TCA 沉淀法结合 LC-MS/MS 技术用于牛乳中 SEA 的检测, 回收率在 80%左右。TONACINI 等^[35]使用甲醇氯仿沉淀制备方法, 结合 MALDI-TOF MS 对金黄色葡萄球菌液中的 SEA、SEB、SEC 以完整蛋白形式实现鉴定, 但该方法应用于牛奶样品时, 由于基质成分复杂, 干扰肠毒素的检出。因此, 利用 MALDI-TOF MS 检测食品中肠毒素时, 需要提高样品前处理方法的特异性。

蛋白沉淀法是目前肠毒素提取的最普遍方法, SOEJIMA 等^[36]发现 TCA 沉淀法中, 三氯乙酸、氯仿和盐酸可能会破坏肠毒素分子结构, 造成沉降过程中含量损失。蛋白沉淀法虽然简单易行, 由于实际样品复杂多样, 低丰度蛋白质容易受到高丰度蛋白信号抑制, 影响质谱检测灵敏度。

表 1 金黄色葡萄球菌肠毒素的检测方法比较
Table 1 Comparison of detection methods for staphylococcal enterotoxins

时间	检测方法	优点	缺点	参考文献
1930—1980s	动物实验	判断直观, 准确	实验动物来源困难, 特异性差, 灵敏度低	[16]
1960—1990s	血清学实验	灵敏度高, 操作简单	半定量, 缺乏特异性	[17]
1970—至今	酶联免疫法	灵敏度高, 特异性强	容易引起交叉反应, 假阴性假阳性高	[18]
1990—至今	分子生物学	可靠, 特异性强, 快速简便	实验技术要求较高, 不能证实蛋白的表达	[19]
1990—至今	生物传感器	高亲和力, 选择性、稳定性好	灵活性差, 难以从不同的基质中捕获目标分子	[20]
2000—至今	质谱仪器法	灵敏、快速准确、高通量, 可定量	样品前处理复杂, 电荷竞争抑制效应	[21]

3.2 超滤法

超滤法是使用一定分子截留量的过滤器, 确保截留在肠毒素(20~30 kDa)的分子量范围内, 选择性浓缩样品中的肠毒素。SOEJIMA 等^[36]采用超滤法替代 TCA 沉淀法提取肠毒素, 得到的回收率与 TCA 沉淀法相近, 但超滤法更为简单、快速、可靠, 适用于多种乳制品的浓缩方法进行常规的肠毒素检测。

CALLAHAN 等^[37]采用两步超滤法, 第 1 步从样品中去除低分子量成分, 用胰蛋白酶消化剩余的含有蛋白质的高分子量成分。第 2 步从残留的生物聚合物中分离出肠毒素酶解片段, 并用 LC-MS/MS 进行分析, 可检测到苹果汁中 5 ng/mL 的 SEB。MURATOVIC 等^[38]同样应用超滤法结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)。超滤后再酶解, 有效避免了食物中多余酶解片段在质谱图上的分布, SEA 和 SEB 在牛奶和对虾中的定量限(limit of quantitation, LOQ)和检测限(limit of detection, LOD)均为 2.5 ng/g。超滤法通常作为样品浓缩的第一步, 与其他方法相结合, 有助于进一步对完整蛋白或酶解后的多肽进行质谱分析, 提高质谱检测肠毒素的灵敏度。

3.3 离子交换树脂法

离子交换树脂法是蛋白质纯化常用的分离技术之一, 由于离子洗脱通常在温和的条件下进行, 蛋白质在洗脱过程中不会发生变性。BALABAN 等^[39]使用阳离子交换剂羧甲基纤维素从蘑菇和婴儿大豆配方奶粉中提取 SEB, 结合蛋白质免疫印迹法检测, 回收浓度可低至 0.75 ng/g。ASAO 等^[40]讨论了离子交换树脂作为 SEA 的提取方法, 使用阳离子交换剂羧甲基纤维素琼脂糖凝胶批量从乳制品中提取 SEA, 并应用免疫试剂盒检测 SEA。

HAMADA 等^[41]利用阳离子交换树脂(磺丙基葡聚糖)从米糕中吸附肠毒素并洗脱, 接着用 mini VIDAS 试剂盒检测 SEA 和 SEC1, 证实了肠毒素与金黄色葡萄球菌食物中毒爆发事件有关。FUJIKAWA 等^[42]采用阳离子交换树脂从乳制品中提取肠毒素, 结合荧光免疫分析法测定, SEA 回收率为 60%左右, SEB 的回收率只有 30%。文章探讨了等电点与洗脱条件造成的差异, 但只探究了 SEA 的最优洗脱条件, 尚未开发肠毒素通用洗脱方法, 该方法不具备通用性。离子交换树脂虽然具有更高的选择性, 可以提高肠毒素的检测限, 但由于操作过程烦琐费时, 回收率偏低, 与质谱的结合应用有待进一步开发。

3.4 免疫磁珠法

磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)性质稳定, 体积小, 通过表面修饰不同官能团可连接不同的配体(如抗体、核酸等)以特异性吸附目标物, 被广泛应用于实际样品中的分离与提取。操作简单, 只需要通过外界磁场操

纵, 即使在复杂介质中也可实现高灵敏度的检测^[43]。随着抗体技术的发展, 免疫磁珠富集技术已成为细胞分选和蛋白质组学研究的重要技术支持^[44]。MNPS 作为免疫磁分离试剂, 为待分析物提供了更高效、更快速地富集和纯化, 使样品前处理方法发生了革命性的变化。

NISTER 等^[45]将氧化铁-硅壳层磁性纳米复合材料(iron oxide-silicon shell magnetic nanocomposites, MNCs)与 SEB 抗体联用, 建立了一种基于免疫磁珠(immunomagnetic bead, IMB)的高灵敏化学发光夹心免疫分析方法, SEB 于牛奶中的检测限为 50 ng/L。SCHLOSSER 等^[46]将 SEB 抗体固定在商品化磁珠上, 制备了亲和分子探针用于选择性分离 SEB, 优化了亲和捕获程序, 并结合 MALDI-TOF MS 对 SEB 进行检测, 检测限为 6 ng/mL。ADRAIT 等^[47]采用免疫磁珠法结合 nano-LC-MS/MS, 通过稳定同位素作为内标的蛋白质标准绝对定量方法(protein standard absolute quantitative methods, PSAQ), 对血液样本中的 SEA 进行高灵敏检测和绝对定量, SEA 的 LOD 和 LOQ 分别为 352 pg/mL 和 1057 pg/mL。BRAGINA 等^[48]提出了一种侧向流动(lateral flow, LF)平台(见图 1), 能够对抗原有效预浓缩和磁性富集, 在 LF 测试条上能够准确定量, SEB 检测灵敏度高达 6 pg/mL。NEDELKOV 等^[49]建立了生物分子相互作用分析质谱(biomolecular interaction analysis of mass spectrometry, BIA/MS)检测 SEB 的方法, 通过免疫亲和捕获表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)结合 MALDI-TOF 质谱分析, 对蘑菇中的 SEB 检测限可低至 1 ng/mL。

免疫磁珠法虽然操作简单、快速、不受实际样品基质的限制、灵活性高, 但由于使用特异性抗体, 只能检测单一毒素, 无法实现对肠毒素的多重检测, 不具备通用性, 存在一定局限性。

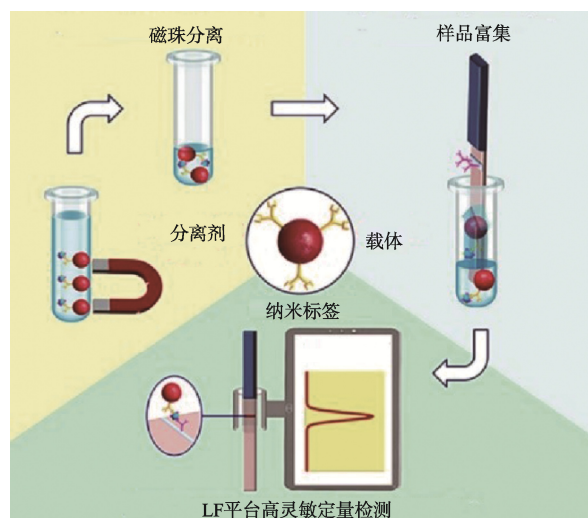


图 1 MNP-LF 检测平台示意图

Fig.1 Proposed platform concept of MNP-LF

3.5 凝胶电泳法

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白分离技术与质谱的结合已广泛应用于蛋白质组学研究^[50], 一维 SDS-PAGE 根据不同蛋白质分子量的差异进行分离, 二维双向凝胶电泳在一维的基础上, 根据分子量与等电点两步分离, 适用于更为复杂的蛋白混合物系统。SOSPEDRA 等^[51]利用 SDS-PAGE 分离肠毒素, 胶内酶解后的肽段通过 MALDI-TOF 质谱检测, 从牛奶样品中鉴定出 13 个 SEA 的特征肽, 多肽序列覆盖率达到 58%, 可应用于牛奶中的肠毒素的微量分析。DUPUIS 等^[52]通过免疫捕获结合 SDS-PAGE 凝胶电泳法, 使用 nano-LC-QTOF-MS 对可可珍珠里的 SEA 进行蛋白质标准绝对定量检测, 定量限约为 1.47 ng/g。SDS-PAGE 作为样品前处理手段具有成本低、适用性强等优点, 但其操作过程烦琐, 费时费力, 不利于肠毒素的快速检测。归纳整理后见表 2。

3.6 分子印迹法

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)是一类对目标分子具有高选择性和亲和力的新型材料。MIPs 具有与目标印迹分子大小和形状互补的空腔, 因此具备特异性识别功能。与蛋白质和核酸、抗体相比, 分子印迹聚合物更稳定, 能够抵抗更苛刻的条件, 如高温、极端 pH、压力和有机溶剂。MIPs 是一种稳定、经济的传感元件, 有望替代天然受体和抗体用于检测。

YAO 等^[53]以丙烯酰胺(acrylamide, AM)和 N,N-亚甲基双丙烯酰胺为聚合单体, 以 SEB 为模板, 采用反相悬浮聚合合法制备了 SEB 印迹聚丙烯酰胺凝胶小球(protein-imprinted polyacrylamide gel beads, IPGB)(见图 2)。SEB-IPGB 的吸附能力接近非印迹凝胶珠吸附能力的 3 倍, 对 SEB 的吸附容量为 8.40 mg/g。与其他蛋白质相比, 对 SEB 表现出良好的识别能力。合成的 SEB-IPGB 有望成为未来蛋白质毒素分离、提取和纯化的潜在材料。

4 结束语

综上, 肠毒素的质谱检测方法是近年来的研究趋势, 具有高通量、高特异性、准确性高等优势, 随着质谱方法的不断发展, 样品前处理的优化也受到人们的广泛关注。蛋白沉淀法与超滤法是最常用的样品前处理方法, 具有简单、操作方便的优势, SDS-PAGE 方法、免疫磁珠法、高效液相分离技术与质谱技术的结合已较为成熟, 分子印迹及离子交换树脂方法结合质谱学方法还存在较大的空白, 具有良好的应用前景。目前大多数样品前处理方法仅针对菌液、牛奶等液体样品, 对于复杂的固体基质研究较少, 而肠毒素中毒事件在肉制品中时有发生。因此, 为拓展更为复杂的食品基质检测, 追求更加快速简便的方法仍需改进现有方法, 不断开发新的前处理方法。且目前大多数检测方法只针对 1 种或 2 种肠毒素, 肠毒素的多重检测及新型肠毒素将会是未来的研究方向。

表 2 金黄色葡萄球菌肠毒素质谱检测方法
Table 2 Staphylococcal enterotoxins detection methods based on MS

基质	毒素	样品处理方法	检测方法	检测限	参考文献
牛奶、果汁	SEA, SEB	沉淀法、过滤法	LC-MS	25 ng/mL	[30]
牛奶	SEA, SEB	透析法	UPLC-MS/MS	8 ng/mL	[31]
鸡肉	SEB	TCA 沉淀、超滤	LC-MS/MS	6 ng/mL	[33]
牛乳	SEA	pH 调节、TCA 沉淀	LC-MS/MS	10 ng/mL	[34]
菌株培养液	SEA, SEB	甲醇氯仿沉淀	MALDI-TOF MS	100 ng/mL	[35]
苹果汁	SEB	超滤法	LC-MS/MS	5 ng/mL	[37]
牛奶、虾	SEA, SEB	等电沉淀、超滤	UPLC-MS/MS	2.5 ng/g	[38]
牛奶	SEB	免疫磁珠法	MALDI-TOF MS	6 ng/mL	[46]
血清	SEA	免疫磁珠法、SDS-PAGE	nano-LC-MS/MS	352 pg/mL	[47]
蘑菇	SEB	免疫亲和捕获	MALDI-TOF MS	1 ng/mL	[49]
牛奶	SEA	SDS-PAGE	MALDI-TOF MS	150 ng/mL	[51]
可可珍珠	SEA	免疫捕获、SDS-PAGE	nano-LC-QTOF MS	1.47 ng/g	[52]

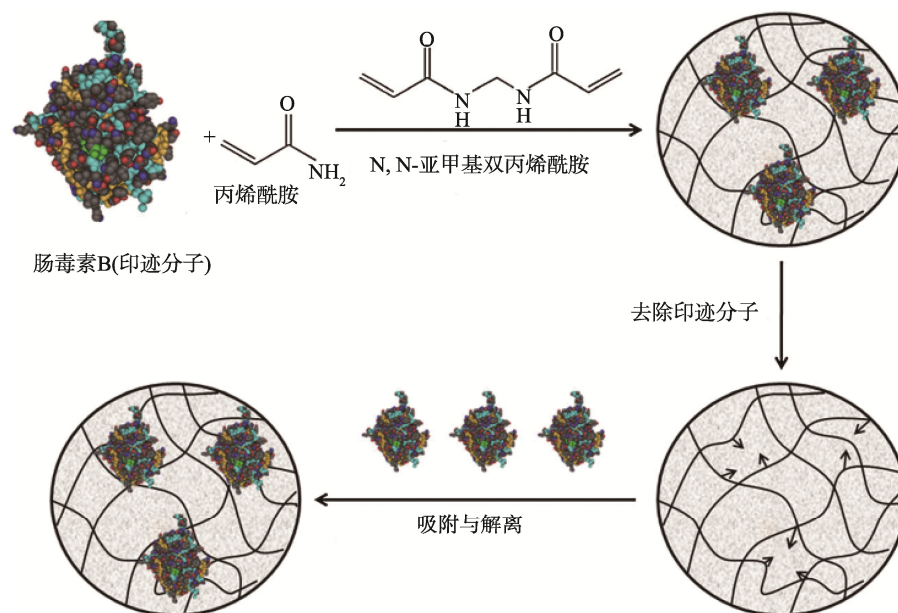


图2 SEB-IPGB 印迹小球合成图

Fig.2 SEB-IPGB imprinted sphere synthesis diagram

参考文献

- [1] JENUL C, HORSWILL AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): 1128–1138.
- [2] CHO SH, KIM JH, KIM JC, *et al.* Surveillance of bacterial pathogens associated with acute diarrheal disease in the Republic of Korea during one year, 2003 [J]. J Microbiol, 2006, 44(3):327–335.
- [3] WU S, DUAN N, GU H, *et al.* A Review of the Methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(7): 176–196.
- [4] SEO KS, BOHACH GA. *Staphylococcus aureus* [J]. Food Microbiol, 2007, 22: 493–518.
- [5] SCALLAN E, HOEKSTRA RM, ANGULO FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7–15.
- [6] 郝民, 王恒伟, 邵希凤, 等. 北京市朝阳区食物中毒相关金黄色葡萄球菌病原学分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 6246–6250.
- [7] HAO M, WANG HW, SHAO XF, *et al.* Etiological analysis of *Staphylococcus aureus* associated with food poisoning [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(17): 6246–6250.
- [8] LIU Y, CHEN W, ALI T, *et al.* Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells *in vitro* [J]. Toxins (Basel), 2014, 6(12): 3552–3567.
- [9] BENKERROUM N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(12): 1943–1970.
- [10] DICKS J, TURNBULL JD, RUSSELL J, *et al.* Genome sequencing of a historic *Staphylococcus aureus* collection reveals new enterotoxin genes and sheds light on the evolution and genomic organization of this key virulence gene family [J]. J Bacteriol, 2021, 203(10): e00587.
- [11] BALABAN N, RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 61(1): 1–10.
- [12] KÉROUANTON A, HENNEKINNE JA, LETERTRE C, *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 115(3): 369–375.
- [13] ONO HK, SATO O Y, NARITA K, *et al.* Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(20): 7034–7040.
- [14] FISHER EL, OTTO M, CHEUNG GYC. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 436–454.
- [15] MOURENZA Á, GIL JA, MATEOS LM, *et al.* Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by staphylococcal species [J]. Pathogens, 2021, 10(2): 91–103.
- [16] ZEAKI N, JOHLER S, SKANAMIS PN, *et al.* The role of regulatory mechanisms and environmental parameters in staphylococcal food poisoning and resulting challenges to risk assessment [J]. Front Microbiol, 2019, (10): 1307–1319.
- [17] FULTON F. Staphylococcal enterotoxin—with special reference to the kitten test [J]. Brit J Exp Pathol, 1943, 24(2): 65–72.
- [18] ROSE SA, BANKES P, STRINGER M, *et al.* Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit [J]. Int J Food Microbiol, 1989, 8: 65–72.
- [19] NOURI A, AHARI H, SHAHBAZZADEH D. Designing a direct ELISA kit for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk samples [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107: 1732–1737.
- [20] MAHFOOZI A, SHIRZAD-ASKI H, KABOOSI H, *et al.* Identification of the classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* in various foods

- by multiplex PCR assay [J]. Iran J Vet Res, 2019, 20(3): 209–212.
- [20] ZHANG X, KHAN IM, JI H, *et al.* A label-free fluorescent aptasensor for detection of staphylococcal enterotoxin A based on aptamer-functionalized silver nanoclusters [J]. Polymers (Basel), 2020, 12(1): 152–164.
- [21] LEFEBVRE D, BLANCO-VALLE K, FERAUDET-TARISSE C, *et al.* Quantitative determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxins types A to I and variants in dairy food products by multiplex immuno-LC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(8): 2603–2610.
- [22] 王铜, 陶晓霞, 孟凡亮, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法新进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1475–1480.
- WANG T, TAO XX, MENG FL, *et al.* New advances detection in the *Staphylococcus aureus* enterotoxin [J]. J Pathog Biol, 2019, 14(12): 1475–1480.
- [23] BENKERROUM N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(12): 1943–1970.
- [24] 霍冰洋, 苑帅, 张曼, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 检测方法的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2049–2055.
- HUO BY, YUAN S, ZHANG M, *et al.* Research progress of the detection method in staphylococcal enterotoxin B [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 2049–2055.
- [25] SCHWENDIMANN L, MERDA D, BERGER T, *et al.* Staphylococcal enterotoxin gene cluster: Prediction of enterotoxin (SEG and SEI) production and of the source of food poisoning based on *vSaβ* typing [J]. Appl Environ Microbiol, 2020, 87(5): e02662.
- [26] CUI L, LU H, LEE YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases [J]. Mass Spectrom Rev, 2018, 37(6): 772–792.
- [27] KANG L, WENG N, JIAN W. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34(1): e4633.
- [28] REEVE MA, BACHMANN D. MALDI-TOF MS protein fingerprinting of mixed samples [J]. Biol Methods Prot, 2019, 4(1): bpz013.
- [29] NIA Y, RODRIGUEZ M, ZELENY R, *et al.* Organization and ELISA-based results of the first proficiency testing to evaluate the ability of European Union laboratories to detect staphylococcal enterotoxin type B (SEB) in buffer and milk [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(9): 268–282.
- [30] SOSPEDRA I, SOLER C, MANES J, *et al.* Rapid whole protein quantitation of staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2012, 12(38): 54–69.
- [31] ANDJELKOVIC M, TSILIA V, RAJKOVIC A, *et al.* Application of LC-MS/MS MRM to determine staphylococcal enterotoxins (SEB and SEA) in milk [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(4): 118–131.
- [32] MEYRAND A, ATRACHE V, BAVAI C, *et al.* Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products [J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 28(6): 411–415.
- [33] BAO KD, LETELLIER A, BEAUDRY F. Analysis of *Staphylococcus* enterotoxin B using differential isotopic tags and liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(9): 1049–1057.
- [34] KOIKE H, KANDA M, HAYASHI H, *et al.* Quantification of staphylococcal enterotoxin type A in cow milk by using a stable isotope-labelled peptide via liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Addit Contam A, 2019, 36(7): 1098–1108.
- [35] TONACINI J, STEPHAN D, VOGEL G, *et al.* Intact *Staphylococcus* enterotoxin SEB from culture supernatant detected by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(2): 101–112.
- [36] SOEJIMA T, NAGGAO E, KUBOTA T, *et al.* Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 93(2): 185–194.
- [37] CALLAHAN JH, SHEFCHECK KJ, TRACIE L, *et al.* Detection, confirmation, and quantification of staphylococcal enterotoxin B in food matrices using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2006, 78: 1789–1800.
- [38] MURATOVIC AZ, HAGSTROM T, ROSEN J, *et al.* Quantitative analysis of staphylococcal enterotoxins A and B in food matrices using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Toxins (Basel), 2015, 7(9): 3637–3656.
- [39] BALBAN N, RASOOLY A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 64(1): 33–40.
- [40] ASAO T, KUMEDA Y, KAWAT T, *et al.* An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk [J]. Epidemiol Infect, 2003, 130(1): 33–40.
- [41] HAMADA Y, OKUNO J, INO Y, *et al.* Estimation of the amount of enterotoxins in Kusadaifukumoti suspected to be food that caused *Staphylococcus aureus* food poisoning [J]. J Food Microbiol, 2013, 30: 48–51.
- [42] FUJIKAWA H, HIRAYAMA W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin [J]. Food Control, 2017, 73: 720–725.
- [43] TREGUBOV AA, NIKITIN PI, NIKITIN MP. Advanced smart nanomaterials with integrated logic-gating and biocomputing: Dawn of theranostic nanorobots [J]. Chem Rev, 2018, 118(20): 10294–10348.
- [44] WINTER SJ, KRUEGER A. Magnetic bead-based enrichment of murine MAIT cells [J]. Methods Mol Biol, 2020, (2098): 299–305.
- [45] NISTLER A, NIESSENER R, SEIDEL M. Magnetic nanocomposites: Versatile tool for the combination of immunomagnetic separation with flow-based chemiluminescence immunoassay for rapid biosensing of staphylococcal enterotoxin B in milk [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(19): 4951–4961.
- [46] SCHLOSSER G, KASER P, KUZMA M, *et al.* Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(21): 6945–4952.

- [47] ADRAIT A, LEBERT D, TRAUCHESSEC M, *et al.* Development of a protein standard absolute quantification (PSAQTM) assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in serum [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(10): 3041–3049.
- [48] BRAGINA VA, ZNOYKO SL, ORLOV AV, *et al.* Analytical platform with selectable assay parameters based on three functions of magnetic nanoparticles: Demonstration of highly sensitive rapid quantitation of staphylococcal enterotoxin B in food [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(15): 9852–9857.
- [49] NEDELKOV D, NELSON RW. Detection of staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5212–5215.
- [50] MATSUMOTO H, HANIU H, KOMORI N. Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1855: 101–105.
- [51] SOSPEDRA I, SOLER C, MANES J, *et al.* Analysis of staphylococcal enterotoxin A in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(5): 1525–1531.
- [52] DUPUIS A, HENNEKINNE JA, GARIN J, *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks [J]. *Proteomics*, 2008, 8(22): 4633–4636.
- [53] YAO W, NING B, YIN H, *et al.* Polyacrylamide gel beads for the recognition of staphylococcal enterotoxin B [J]. *Polym Advan Technol*, 2014, 25(8): 900–904.

(责任编辑: 于梦娇 郑丽)

作者简介



林梅英, 硕士研究生, 主要研究方向为食品药品质量控制及微生物快速检测。
E-mail: linmeiying1015@126.com



秦 峰, 博士, 主任药师, 主要研究方向为食品药品微生物检验技术、痕量物质分析与实验室质量管理。
E-mail: sifdcqinf@163.com