金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展

徐振波[1,2]，刘晓晨[1]，李琳[1]，李冰[1]

（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2. 美国马里兰大学生物医学科学系，巴尔的摩 21201）

摘要：由细菌污染引起的食源性疾病依然是影响人类公共健康和食品安全的最大问题之一。其中，金黄色葡萄球菌是人类的一种重要病原菌，引起许多严重感染。金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性球菌，广泛分布于自然界，是引起化脓性疾病的重要病原菌，也是引起食品污染和细菌性食物中毒的一种重要细菌。食品受金黄色葡萄球菌污染后，不仅会腐败变质，而且部分菌株产生金黄色葡萄球菌肠毒素(*Staphylococcal* enterotoxins, SEs)而引起食物中毒，由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的首位。所以，对SEs的研究以及快速、精确的检测和筛查，成为关键环节。本文拟对金黄色葡萄球菌肠毒素生物学性状、致病性、检验方法等方面的研究进展进行综述。当然，对金黄色葡萄球菌及其主要致病因子肠毒素的研究有待进一步深入与发展。

关键词：金黄色葡萄球菌；食品安全；食源性微生物；金黄色葡萄球菌肠毒素

文章篇号：1673-9078(2013)9-2317-2324

Development of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin in Food-borne Bacteria

XU Zhen-bo[1,2], LIU XIAO-chen[1], LI Lin[1], LI Bing[1]

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Department of biomedical science of university of Maryland, Baltimore 21201**)**

Abstract: Bacteria pollution causes food-borne illness is one of the biggest problems which affect human public health and food safety. Among these Bacterias, *Staphylococcus aureus* is an important human pathogen which can cause many serious infections. *Staphylococcus aureus* is a widely distributed Gram-positive organism, which is responsible for a lot of infectious diseases, as well as a major food-borne pathogen taking up many food poisoning cases. Food samples contaminated by this organism will decay rapidly and the toxin named enterotoxin may produced by *S. aureus*, (SEs) resulting in severe food poisoning in human being. Therefore, the studies on fast, accurate detection and screening of SEs became more important .This article introduced the recently development of enterotoxin, including the biological characteristics, pathogenesis and detection methods.

Key words: *staphylococcus aureus*; food safety; food-borne bacteria; enterotoxins

当前，由细菌污染引起的食源性疾病依然是影响人类公共健康和食品安全的最大问题之一，每年食源性病原体导致 1400 万人患病，60000 人住院，1800 人死亡[1]。其中，葡萄球菌引起的食品中毒已成为食品安全领域的重点课题，最突出的是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）。

据美国疾病控制中心报告，在美国由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒数量仅次于大肠埃希菌，居第 2 位，占细菌性食物中毒的 33%，而在加拿大则占 45%，在某些欧洲国家如匈牙利、芬兰等则占食物中毒事件的 50%以上。在 1983~1997 年之间，美国每年约平均有 18.5 万人因葡萄球菌而发生中毒，引起的医疗损失达 15 亿美元。在欧洲，15 个欧盟国家在 1993~1998 年之间共有 926 起葡萄球菌中毒事件。根据日本卫生部的研究显示，在 1980~1999 年之间日本共有 2525 起由葡萄球引起的中毒报道；而 2000 年发生的“雪印奶粉”事件，14000 多人受感染[2]。在我国，每年由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件也是屡见不鲜，一

收稿日期：2013-04-04

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31201362）；中央高校基本科研业务费资助项目博士启动项目（2012ZB0022）；淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心开放基金项目（2011-2012）

作者简介：徐振波（1982-），男，博士，讲师，研究方向：食品微生物耐药性与毒性机制的研究

通讯作者：李冰（1972-），女，博士，教授，研究方向：食品体系中危害物的检测与生成机制研究

般金黄色葡萄球菌在食物样品中的分离率在5%以下。如广州、深圳和佛山的检出率分别为3%（6/195）、3%（9/340）和4%（10/257）[3~5]。在某些地区报道中，金黄色葡萄球菌的检测率较高，如河北报道为21.2%（108/510）[6]，北京则为21.2%（44/204），其中生奶生肉与水产品检出率较高，均超过30%，而在44株金黄色葡萄球菌中有产肠毒素的达27株，占61%[7]。金黄色葡萄球菌在不同地区的分离检出率差别较大，除了调查还不够系统和全面外，各地不同的饮食习惯和食品类型也是主要原因之一，此外，菌株差异也可能是引起差别的原因之一。

1 金黄色葡萄球菌肠毒素（*Staphylococcal enterotoxins*，SEs）的生物学性状

SEs主要是指在特定条件下由金黄色葡萄球菌所产生的一类结构相似、毒力相似、而抗原性各不相同的胞外单链小分子蛋白质，SEs具有很高的热稳定性，此外还具有的超抗原活性，属于超抗原蛋白，可以刺激非特异性T细胞增殖。

1.1 SEs的分型

经典的SEs可依据其抗原性和等电点的不同分为SEA、SEB、SEC、SED、SEE等5种类型[8]，其中SEC又可分为SEC1、SEC2和SEC3等3种亚型。随着分子生物学新的检测技术的发展和应用，一些新的SE相关毒素相继被发现，如：SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SER等，其中尤以A型的毒力最强，是引起食物中毒最多的毒素。SEs各型之间有着相似的结构和功能，SEs基因序列间的相似性较高，而部分毒素基因存在密切的连锁关系[9]。

1.2 SEs的结构

各型SEs的分子量相近，都属于小分子蛋白质，在26~30 Kda之间，由约230个氨基酸组成。SEs水解后能释放出18种氨基酸，其中以赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸和酪氨酸较为集中，大多数肠毒素都含有2个半胱氨酸残基共价结合而成的大约20个氨基酸的胱氨酸环[10]。组成SEs肽链的氨基酸残基数目各个型别不一样，但所有SEs都有相同的基本结构，即含有二硫键和单一肽链，不含有碳水化合物、脂肪和核酸。

1.3 SEs的理化性质

SEs易溶于水和盐溶液，等电点为7.0~8.6，SEs能抵抗肠胃中的蛋白酶的水解作用，在不同程度上对热有一定的抵抗力。金黄色葡萄球菌的菌体细胞在80 ℃下经30 min即可被杀灭，而SEs可耐受100 ℃高温煮沸30 min还维持其生物活性和免疫活性[11]，必须在218~248 ℃下经30 min才能使其毒性完全消失。

1.4 SEs的超抗原作用

超抗原(Superantigen，SAg)是指一类只需极低浓度即可激活大量的T细胞活化并产生极强的免疫应答的抗原因子，通常由细菌病毒、支原体产生。细菌毒素超抗原只需极低浓度(1-10ng/ml)即可刺激强烈的免疫应答，可激活的T淋巴细胞数量比普通抗原多10^3-10^5倍。SEs无需抗原递呈细胞(Antigenpresenting cells，APC)的加工，而可直接与抗原递呈细胞的MHC及T细胞的T细胞受体（T cell receptor，TCR）结合并具有强大杀伤力的T淋巴细胞，同时促使它们增殖并产生强烈的细胞毒性作用，释放高水平的细胞因子，对肿瘤细胞具有强大的杀伤作用[12]。SEs在发挥其超抗原特性前必须先与APC细胞和T细胞交叉结合，再由后者递呈给T细胞。此外，SEs可通过特异的抗原决定簇与肿瘤细胞结合并使其凋亡，从而发挥直接或间接的抗肿瘤作用，有关SEs抗肿瘤作用及机制的研究，相关重组超抗原SEs基因的克隆和表达载体的构建研究，是目前临床微生物学研究的重点。

SEs导致食物中毒和刺激T细胞增殖的超抗原特性是由SEs蛋白质的不同结构区域所控制，它们之间存在很大的相关性，超抗原活性的损失往往会伴随肠毒素活性的减少。

1.5 影响SEs产生的因素

SEs的产生与环境的水活度、酸碱度和温度密切相关。产A型SEs的pH范围较广，一般要求pH>4.5，a_w>0.86，这也是A型SEs引起食物中毒最多的原因所在。产B型和C型SEs的pH范围较窄，均为pH中性。B型SEs的产生主要取决于水活度，在适宜温度下，B型的最低水活度a_w>0.96。在温度低于8 ℃、pH值小于4.0、a_w<0.80、厌氧等条件下，可以有效地抑制金黄色葡萄球菌的生长繁殖，同时阻止SEs的产生；一般而言，温度在37 ℃左右、pH在7.4左右、aw大于0.85，在氧气和二氧化碳充足的环境中金黄色葡萄球菌生长迅速，能产生大量SEs。

1.6 金黄色葡萄球菌与SEs的关系

不同金黄色葡萄球菌产生的SEs种类有很大差异，一株金黄色葡萄球菌能产生一型或两型以上的SEs，在产混合型SEs菌株中又常以产某一型的SEs为主。此外

有研究者在研究金黄色葡萄球菌的耐药性时，发现该菌的耐药性也与SEs的产生有关联，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)近100%产生SEs；而对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)仅约有30％产生SEs。

2 SEs的病理学特性

2.1 SEs 的致病性

无论是在发达的工业化国家和发展中国家，由SEs引起的食物中毒一直威胁着人类健康。SEs可导致中毒性休克及许多过敏和自身免疫疾病，它是引起人类食物中毒和葡萄球菌胃肠炎的主要原因。在由SEs引起的食物中毒中，有75%以上是由SEA引起的，其次依次是SED、SEC和SEB，各种类型的肠毒素均能引起食物中毒。

SEs引起食物中毒的特征是潜伏期短，大约在进食后2-6小时发作，伴随有恶心、呕吐、腹痛以及腹泻等症状。近年来还发现SEs能引起或参与其它一些疾病，如肠炎、败血症、皮肤感染或某些疾病的中毒休克等。

SEs导致食物中毒症状的机制还未完全证实，Marrack、Kappler、Kortz和Kalland[13~15]等人认为SEs并不直接作用于胃肠道的细胞，而主要是通过T细胞、其次是巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞等产生的细胞因子和代谢产物的间接作用而导致呕吐和腹泻，因为细胞因子大量使用时可引起发热、减轻体重和渗透性失衡以至死亡。此外，SEs的超抗原作用刺激T细胞增殖，导致宿主在感染初期IgM的合成受到抑制，加以单核巨噬细胞的消除功能障碍，细菌大量生长繁殖，产生内毒素，并使宿主对内毒素休克及心、肝坏死的敏感性增加。另外的原因还可能是SEs随食物进入胃肠道，毒素与肠道神经细胞受体作用，并被吸收入血液后到达中枢神经系统刺激呕吐中枢，导致以呕吐为主的食物中毒。

SEs在由金黄色葡萄球菌引起的化脓性感染中也起重要作用，李红云[16]等在进行烫伤脓毒血症大鼠急性肺损伤研究时发现SEB的单克隆抗体能够对烧伤合并葡萄球菌感染的肺损伤起到明显的保护作用，同时SEB能促使炎症细胞因子产生显著增加，致使炎症细胞浸润，组织坏死，尤其是肺组织中的中性粒细胞聚集更加明显，而肾脏有储蓄和排泄肠毒素的功能，所以毒素对肾脏的损伤也较明显，以至产生对全身其他各器官组织的损伤作用，最后发展到多个器官功能障碍，危及患者生命。

虽然川崎病的病因目前还不是十分清楚，但是有研究[17]认为其发病与免疫系统激活有密切关系：由于T细胞、巨噬细胞活化以及细胞因子的释放导致了以心血管损伤为中心多种抗原刺激后的变态反应，内皮细胞的走与血管壁的损伤是诱发本病的最重要因素，它最终能导致冠状动脉瘤以及内腔狭窄。SEs作为超抗原能够激活大量淋巴细胞继而产生大量的细胞因子，使免疫球蛋白合成增加，产生自身抗体，同时可诱导粘附分子在血管内皮细胞上的表达，导致内皮细胞的损伤及游走，这些因素是启动川崎病动脉炎发生的重要原因。

2.2 SEs 中毒的临床表现

SEs 在进入人体消化系统后被吸收进入血液，通过刺激中枢神经系统可引起剧烈的中毒反应。一般潜伏期较短，约 1~5 h，很多超过 6 h，最短的仅 15 min，最长也不超过 8 h。其临床特点如症状表现包括，起病突然急剧，先出现恶心，后反复呕吐，严重者一天可达 10~20 次；吐出物初为食物，以后为水样物，严重者可吐胆汁或含血及粘液，同时并伴有上腹不适和疼痛、头晕、腹泻、发冷等症状；腹泻则一般较轻，多为水样泻，少数重症病人由于剧吐和频泻可致脱水和肌痉挛，甚至循环衰竭；体温则一般正常或低热；吐泻症状多于数小时内缓解，1~2 d 内即能恢复，大多预后良好。各年龄组均可得病，病愈后不产生明显的免疫力；儿童对肠毒素比成人敏感，因此儿童发病率较高，病情也比成人严重。但总的来说，金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒病程较短，且愈后良好，一般不导致死亡。

2.3 SEs 的预防、诊断与治疗

由于金黄色葡萄球菌引起食物中毒主要是通过产生SEs引起的，因此预防手段主要集中于防止细菌污染和阻碍肠毒素形成两个方面；具体措施包括：防止细菌污染食品，如防止带菌人群对食品的污染和葡萄球菌对食品原料的污染；防止带有肠毒素菌株的蔓延，一般由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒潜伏期较短，症状急剧，常呈现集体性暴发，短时间出现多人同时发病及相似的临床表现；但一般人和人之间不直接传染。据此，在诊断方面，只要根据进食的可疑污染食物，如同餐者在6 h内陆续出现症状，如剧吐、腹痛和水样泻等，即可进行临床实诊。其方法是取可疑食物及病人的吐泻物等进行细菌培养，然后对如凝固酶（阳性即为金黄色葡萄球菌）等进行检测，即可确定。在治疗方面，对金黄色葡萄球菌的治疗与沙门氏菌引起的胃肠炎型类似。一般情况下不使用抗生素，临床上通过调理饮食，适量输液，纠正脱水和循环衰竭等，

使病人逐渐康复。对于症状较严重大病人可选用对葡萄球菌敏感的耐酶青霉素或红霉素、头孢噻肟钠等药物。

3 SEs的应用

高聚金葡素（highly agglutinative staphylococcin，HAS）是从金黄色葡萄球菌代谢产物中提取的活性物质，其主要成分即为SEC，是一种活性极强的超抗原生物制剂[18]。HAS具有广泛的生物活性，可抑制和杀死肿瘤细胞，能修复正常组织和细胞，对抗放化疗不良反应，减少癌性渗出，促进胸腔积液吸收，调节宿主免疫应答反应，激活体内的免疫细胞，激发机体对肿瘤的特异性免疫和非特异性免疫，从而减少甚至消除恶性胸腔积液。

HAS可直接激活T淋巴细胞，使T细胞分泌多种细胞因子，如肿瘤坏死因子、IFN、白细胞介素-2（Interleukin-2，IL-2）等，直接或间接杀伤肿瘤细胞，抑制肿瘤细胞生长。另外，HAS还具有较明确的保护骨髓造血功能的作用，对抗放疗、化疗的不良反应，升高白细胞及对抗恶液质的作用；尚可修复损伤的组织细胞、增强巨噬细胞的吞噬能力、增强NK细胞及淋巴因子激活的杀伤细胞（lymphokine activated killer cell）的生物学活性、增强淋巴细胞的转化率，发挥抗肿瘤作用[19~21]。

SEs进入肠胃后具体致病机理等还需进一步的研究。但是，作为一种超抗原，其对各种癌症的治疗有着很可观的前景，关于SEs的药物还需更多的临床验证和开发。

4 SEs的检验方法

金黄色葡萄球菌不耐热，常规的加热处理即可杀灭其菌体,但SEs具有强的耐热性，故此国际上已将SEs检测列入食品检验法规。对于SEs，约1 μg左右的肠毒素就足够使易感人群出现中毒症状；而一般当金黄色葡萄球菌在食物中浓度达到10^5到10^6 CFU/g，即能产生足够的SEs。由于SEs是迄今已知为最有效的T细胞刺激剂，尤其人类T细胞对SEs最为敏感，在浓度达到1 μg/mL即可刺激T细胞，这比任何生物化学或血清学检测法的灵敏度要高出几个数量级。因此，在关于肠毒素的疾病预防和抗癌产品的研发过程中对检测方法的灵敏度和特异性等提出了更高的要求。对肠毒素的检验从传统的细菌培养方法，到改进的免疫学方法，还有之后伴随着分子生物学发展而出现的如聚合酶链反应技术（PCR），荧光定量PCR及环介导恒温扩增法（LAMP）等，使检测灵敏性和特异性有了很大提高，同时在耗时方面也有所改进。在高通量与自动化方面，近年来在计算机技术快速发展下，微生物检测方法开始向自动化、微量化、系列化的方向发展，一系列的检测仪器开始应用于微生物检测。对金黄色葡萄球菌肠毒素的检测方法逐渐趋向于各种主流检测方法互相融合，并且在实际应用中越来越多地依赖于自动化的分析仪器。但这些新方法中也存在不同程度的假阳性反应，仍需结合常规检验方法进一步确定。另外，耐药性的金黄色葡萄球菌不断被发现，使得基于免疫学和分子生物学基础的检测方法也应随着其耐药性的变化而作出相应改进。

按检测原理的不同，SEs的检测方法可分为四大类：动物实验法、免疫血清学方法、核酸扩增法、仪器检测法。

4.1 动物实验法

动物实验法是较早被采用的一种检测SEs的方法，该方法通常选用幼猫和猴作为研究对象，通过腹腔注射或喂食含有SEs的菌株培养液，再观察动物可能出现的各种异常的生理化如呕吐、腹泻等现象来判断SEs的存在。

用猴来进行的动物学试验，可以观察到类似于人的腹泻和呕吐等反应，准确度较高，但灵敏度低，且猴的来源困难，成本高等因素限制了本方法的使用。而采用幼猫作肠毒素试验观察其呕吐反应时，因葡萄球菌产生的其他非肠毒素类产物也可导致幼猫呕吐，易产生假阳性，特异性不强。此外，小鼠、家兔、猪、狗等其它动物亦能作动物学试验，但它们对SEs不敏感，无特异性，故此实用价值低。

动物实验法虽然具有结果判断直观、准确等优点，但由于实验动物来源、灵敏度等缺点，其应用受到的限制，不宜推广。

4.2 免疫血清学方法

随着各型SEs的纯化和相应抗血清的制备等技术的发展，在食品卫生检验中已逐渐采用血清学技术检测SEs，其原理是以肠毒素为抗原，制备相应特异性抗体，通过发生结合性反应，产生可见沉淀进行检测，如免疫琼脂扩散法、反向间接血凝实验法（RPHA）、反向被动乳胶凝集实验法（PRLA）、放射免疫测定法（RIA）、酶联免疫吸附法（ELISA）和酶联免疫化学发光检测法（CLIA）等。

4.2.1 免疫琼脂扩散法

免疫琼脂扩散法是可溶性抗原与特异性抗体相互作用产生沉淀线的一种反应，是各种免疫反应的基础，

也是SEs检测中较早采用的一种免疫学方法。最初采用这种方法检测SEs时，主要有单向琼脂扩散试验和双向琼脂扩散试验。

单向琼脂扩散是将含有抗体的融化琼脂倾注于试管，待凝固后，在琼脂糖上部覆盖SEs溶液，SEs扩散到含抗体琼脂层，形成沉淀线，沉淀线到抗体琼脂层距离对抗原浓度的对数得到一条直线，可以根据已知浓度肠毒素的标准曲线，查得被检标本浓度。这种扩散试验易受温度、pH、盐浓度和扩散时间等各种参数的影响。

双向琼脂扩散是改进的单向扩散，抗原抗体两者在琼脂中扩散，形成的沉淀环位置在抗原抗体孔中间。这两种检测方法灵敏度低，通常只能达到300 ng/mL~500 ng/mL的水平。

免疫琼脂扩散法由于特异性强、准确度高、操作简单、不需仪器设备，但是由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒的最低SEs含量约100 ng，故此检查可疑食品中低浓度SEs时常常需要将食物标本的浸液浓缩，有时甚至要提纯，实验时间长达几天，不能快速检测出结果。

4.2.2 RPHA

RPHA技术是先将各型SEs抗血清通过化学试剂吸附或偶联于绵羊、鸡和人的红血球表面，然后再加入被检的含有相应SEs的标本，出现血细胞凝集即为阳性。该试验简便、快速，检出灵敏度高，可达1 ng/ml，只需1-3小时即可判定结果；其最大优点是能检出食物样品中微量肠毒素，而不需要浓缩样品浸液。

4.2.3 PRLA

PRLA技术是将特异性抗体吸附于聚苯乙烯乳胶颗粒上，当遇到适宜的抗原时，抗原与抗体快速结合，同时乳胶粒子被动凝集起来，从而通过观察乳胶颗粒凝集的数量和程度，判定待检样品中肠毒素的含量。该法不需要特殊仪器和设备，成本较低，灵敏度高，可达0.5 ng/mL，检测SEs可在18 h内完成，可用于快速测定被怀疑污染有肠毒素的食品或用于工厂、实验室中食品的常规质量检测；目前已有商品化的乳胶凝集试剂盒。该方法的缺点是致敏乳胶常发生自凝，降低了其检测的灵敏度，且通常只能检测SEA、SEB、SEC和SED等四种类型的肠毒素。

4.2.4 RIA

RIA技术是建立在标记抗原和非标记抗原对特异性抗体的竞争性抑制反应基础上的，可以将放射性同位素I^{125}等标记到特异性抗体上，用于检测未知样品中的SEs。RIA法将同位素测定的高灵敏性和抗原抗体反应的高度特异性有效结合起来，特异性强，敏感性高，检测样品中各型SEs可达l ng/ml。但RIA需要有放射性废物处理系统，也需要复杂放射性计数设备，从事RIA的工作人员还必须进行专门培训，熟悉技术，持有从事该项工作的许可证，这些均限制了RIA法的使用。

4.2.5 ELISA

ELISA技术是利用酶标记的抗原或抗体在固相载体上进行抗原或抗体的测定。该方法自1971年建立后，以它的敏感、简便、快速、无需特殊仪器等优点深受人们欢迎。其基本方法有三类：间接法、双抗体夹心法和抗原竞争法。人们常用双抗体夹心法来检测肠毒素，其灵敏度为l ng/mL，检测速度快，4 h就可出结果。一般样品不需要进行任何前处理，可直接用于肠毒素的检测，目前已有商品化的ELISA试剂盒，可用于检测肠毒素中的A、B、C、D和E亚型等。ELISA的主要缺点是非相关抗原易引起交叉反应，会造成假阳性，或由于食品加热处理过程中，毒素蛋白发生聚集，虽仍保持毒性，但反应原性降低，而出现假阴性。

4.2.6 CLIA

Halman等[22]将化学发光反应的高灵敏性和抗原抗体反应的高特异性相结合，建立了CLIA技术，其基本原理是发光底物在酶的催化作用下可以产生化学发光，发光强度与反应物或产物的浓度成正比，通过对发光强度的测量进行定性或定量分析。由于发光底物对酶的催化反应的敏感性极高，从而极大地提高了灵敏度。

4.3 核酸扩增方法

4.3.1 PCR技术

PCR技术是一种在体外模拟自然DNA复制的过程，通过设计配对的引物，在DNA聚合酶的作用下快速大量合成特定的DNA或DNA片段的一种核酸扩增方法；PCR技术可从基因水平进行诊断和同时检测大量样品，其高敏感和特异性可以直接应用于检测各类金黄色葡萄球菌的产毒基因，包括肠毒素。1991年，Jonson等最先设计了八对寡核苷酸引物，分别用于检测从临床标本和食品标本中分离到的产A-E亚型肠毒素。Schmitz[23]用多重PCR方法同时测定SEB、SEC亚型和毒性休克综合症毒素（TSST）等多种基因，在四个小时内即可完成。与传统培养或免疫学方法比较，PCR技术具有敏感性高、特异性强、重复性好等特点，可及时提供快速、准确的病原学诊断，且易自动化操作，可以克服传统食品检测方法的缺点和不足。但其缺点包括：易受到食品基质、培养基成分的干扰，残留食物成分也会抑制PCR反应的顺利进行，死亡的金黄色葡萄球菌残留DNA造成的假阳性结果。

4.3.2 荧光定量PCR

1995年出现的以标记特异性荧光探针为特点的荧光定量PCR技术[24~25]，在一定程度上能克服传统PCR的不足和缺点。其特点包括：1、实行完全闭管式操作，大大减少扩增产物交叉污染的风险；2、荧光标记的探针能进一步提高检测的特异性，有效消除非特异性扩增；3、计算机自动分析，在对扩增产物能进行精确定量的同时还能提高检测的灵敏度；4、高通量与自动化，使其操作简便、节省时间，并且能处理大样本量的筛查，如新型的384孔板，能在30~60 min内检测上百个样品。Fischer等利用荧光定量PCR技术，开发针对肠毒素A、B亚型的检测技术，其检出限达0.6~6 pg（4 to 40 amol/μL），与传统PCR比较具有更高的灵敏度与特异性[26]。其缺点主要是仪器与试剂较为昂贵、对实验空间与人员的操作能力有一定要求等，这些限制了其大规模的应用。

4.3.3 LAMP

LAMP技术是设别靶目标序列上的6/8个特异区域，设计4/6条引物；在恒温条件下，利用具有链置换活性的DNA聚合酶（Bst酶），通过形成环状结构及链置换，对目标DNA进行大量扩增并形成多种片段DNA产物的一种新型的核酸扩增方法。该方法的特点包括恒温条件、特异、高效、快速等，目前已广泛应用于病原性微生物包括细菌、病毒、真菌等的检测[27~31]。近年，Goto等基于LAMP技术开发了一种针对SEA、SEB、SEC与SED的检测技术，灵敏度比传统PCR要高，而耗时仅1小时[32]。

4.4 微生物仪器检测法

4.4.1 荧光酶标分析仪（VIDAS）

荧光酶标免疫分析法（ELFIA）是把已知抗体吸附于固相载体，加入待测样本，样本中的抗原与固相载体上的抗体结合，然后酶标抗体再与样本中的抗原结合。加入酶反应的底物，底物会被酶催化为带荧光的产物，该产物的量与标本中受检物质的量直接相关，然后根据荧光强度进行定性或定量分析。VIDAS系统采用了ELFIA技术的检测原理，由电脑控制所有样品的洗涤、结合、基质读数及报告说明，可自动完成全部分析过程。由于同时作标本对照，所以系统本身可以自动消除由标本产生的非特异荧光。经扫描后读数与标准比较，计算出标本值。采用VIDAS设备进行酶联荧光免疫分析，具有灵敏度高、特异性强、操作简单方便等优点，而且对被检细菌不需要纯培养，只要存在于增菌培养基中即可检出。该方法的缺点是在有些情况下会产生非特异性结合而造成假阳性的结果。

4.4.2 压电晶体型生物传感器

生物传感科学是一门新兴的交叉学科，它主要是由生物工程和各种技术学科的相互渗透发展起来的。近些年来，以生物传感技术为基础的各类生物检测系统逐渐被应用于生物毒素检测领域。压电晶体型生物传感器可将抗原和和抗体反应的特异性和高灵敏度的压电质量传感相结合。共振声谱分析(resonant acoustic profiling，RAP)是利用高频压电石英共振器的压电效应对分子间相互结合的亲和力及浓度等进行测定的生物传感系统，Natesan等[33]利用RAP检测SEB，检测的灵敏度达到了0.5 μg/L，在10 min内即可完成检测。压电晶体型生物传感器存在非特异性吸附，其表面选择性会降低。与ELISA相比，虽然有着操作简单、节省时间等优点，但压电晶体型生物传感器检测的灵敏度还需要进一步提高。

5 结语

近年来，关于金黄色葡萄球菌的研究一直成为临床医学与食品科学领域中的热点；总的来说，研究方向不外乎与临床医院感染相关的耐药和病原性[34~39]，与食品科学相关的细菌性食物中毒与食品微生物快速检测。作为细菌性食物中毒的重要病原菌，对金黄色葡萄球菌及其主要致病因子肠毒素的研究有待进一步深入与发展。

参考文献

[1] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning[J]. Genet Mol Res, 2003, 2(1): 63-76

[2] Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR based procedures for detection and quantification of Staphylococcus aureus and their application in food [J]. Journal of applied microbiology, 2006, 100(2): 352-364

[3] 张健,邓志爱,李钏华,等.广州市市售食品食源性致病菌污染状况调查[J].热带医学杂志,2007,7(8):804-806
Zhang J, Deng ZA, Li CH, et al. Investigation on the foodborne pathogen contamination in commercial food products in Guangzhou city [J]. Journal of tropical medicine, 2007, 7(8): 804-806

[4] 贺连华,吴平芳,刘涛,等.深圳市熟食中食源性致病菌污染状况的调查研究[J].中国热带医学,2005,5(2):357-358.
He LH, Wu PF, Liu T, et al. Analysis of results in sterilization of table wares in restaurants of Shenzhen City [J]. China tropical medicine, 2005, 5(2): 357-358

[5] 梁景涛,余淑冰.糕点中金黄色葡萄球菌的污染状况及其理化特性分析[J].广东卫生防疫,2001,27(4):87-89.

Liang JT, Yu SB. Staphylococcus aureus contamination and physicochemical characterization in pastry [J]. Guangdong health and epidemic prevention, 2001, 27(4): 87-89

[6] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等.食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J].中国食品学报,2008,8(3):88-93
Suo YJ, Yu HW, Ling W, et al. Analysis on the contamination of Staphyrlococcus aureus in food [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 88-93

[7] 张兰荣,王连秀,张文利.食品中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性分析[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):35- 36
Zhang LR, Wang LX, Zhang WL. Contamination and drug resistance of Staphyrlococcus aureus in food [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2004, 16(1):35-36

[8] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus anreus [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 16-34

[9] Bania J, Dabrowska A, Bystron J, et a1. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus from food [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 108(1): 36-41

[10] Marrack P, Kapple J. The staphylococcal enterotoxin and their relatives [J]. Science, 1990, 248(4956): 705-711

[11] H M Johnson. Staphyloeoccal enierotoxin micsobcal superantigens [J]. FASEB H.1991,5,270622712

[12] Lando P A, Olsson C, Kalland T, et al. Regulation of superantigen-induced T cell activation in the absence and the presence of MHC class II [J]. The Journal of Immunology, 1996, 157(7): 2857-2863

[13] Marrack P, J Kappler. The staphyloeoccal enierotoxins and their relatives [J]. Seience, 1990, 248: 7052711

[14] Kotzin BL. Super antigens and their Potential role in human disease [J]. Ady Immunol, 1993, 54: 992166

[15] Kalland T. Staphyloeoccal enterotoxins:Applieation for targeted immunotherapy [J]. Zbl Bakt 1994, suppI 27: 2112224

[16] 李红云,姚均明,施志国.金黄色葡萄球菌肠毒素 B 单克隆抗体对烫伤脓毒症大鼠脏器功能的影响[J].中华医学杂志,2000, 80(11):872-873
Li HY, Yao JM, Shi ZG. The influence of Staphylococcal enterotoxin B monoclonal antibody on bum sepsisorgan of rats [J].Natl Med J China, 2000, 80(11): 872-873

[17] Nomura Y, Masuda K,Yoshinaga M. Possible relationship between streptococcal pyrogenic exotoxin A and Kawasaki syndrome in patients older than six months of age [J]. Pedi-atr Infect Dis, 2003, 22(9): 794-800

[18] Curti BD, Longo DL, Ochoa AL, et al. Treatment of cancer patients with ex. vivo anti-CD activated killer cells and interleukin-2 [J]. Clin Oncol, 1993;11: 652-654

[19] 余德彰,高中度.肺动脉持续滴注高聚金葡素治疗中晚期肺癌疗效观察[J].肿瘤防治研究,1996,23(3):194-195
Yu DZ, Gao ZD. Pulmonary continuous infusion of high poly staphylococcin treatment of advanced lung cancer [J]. Cancer research on prevention on prevention and treatment, 1996, 23(3): 194-195

[20] 朱正中.高聚金葡素的免疫增强及抗肿瘤作用[J].中华肿瘤杂志,1995,17(6):477-478
Zhu ZZ. Immune enhancement and anti-tumor effects of high poly staphylococcin [J]. Chinese Journal of Oncology, 1995, 17(6): 477-478

[21] 李同度,李从铸.肿瘤坏死因子抗体和高聚金葡素对抗癌症恶病质初步探讨[J].中华肿瘤杂志,1997,19(3):188- 191
Li TD, Li CZ. Mechanism and treatment of cancer cachexia in tumor-bearing mice [J]. Chinese Journal of Oncology, 1997, 19(3): 188-191

[22] Halmann M, Velan B, Sery T. Rapid identification and quantitation of small numbers of micro rganisms by a chemiluminescent immuno-reaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 34(5): 473-477

[23] Schmitz F J, Steiert M, Holmann B, et al. Development of a mutiplex-PCR for directdetection of the genesforentoxin B and C,and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococccus aureus isolates [J]. MedMicrobiol, 1998, 47(4): 335-340

[24] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluores2 cent dyes at opposite ends p rovide a quenched p robe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. PCR MethodsApp l, 1995, 4(6): 357-362

[25] Chen S, Yee A, GriffithsM, et al. The evaluation of a fluorogenic pol2 ymerase chain reaction assay for the detection of Salmonella species in food commodities [J]. Int J Food Microbiol,1997, 35(3): 239-250

[26] Fischer A, von Eiff C, Kuczius T, et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins [J]. Journal of Molecular Medicine, 2007, 85(5): 461-469

[27] Zhao X, Li Y, Wang L, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection Escherichia coli O157 strains from food samples [J]. Molecular biology reports, 2010, 37(5): 2183-2188

[28] Wang L, Li Y, Chu J, et al. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on

rapid detection of Listeria monocytogenes strains [J]. Molecular biology reports, 2012, 39(1): 445-449

[29] Wang L, Shi L, Alam M J, et al. Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Research International, 2008, 41(1): 69-74

[30] Zhao X, Wang L, Chu J, et al. Rapid detection of Vibrio parahaemolyticus strains and virulent factors by loop-mediated isothermal amplification assays [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(5): 1191-1197

[31] Zhao X, Wang L, Chu J, et al. Development and application of a rapid and simple loop-mediated isothermal amplification method for food-borne Salmonella detection [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(6): 1655-1659

[32] M Goto1, H Hayashidani, K Takatori1, et al. Rapid detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA,SEB,SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Letters in Applied Microbiology, 2007,45(1): 100-107

[33] Natesan M, Cooper MA, Tran JP, et a1. Quantitative detection of Staphylococcal enterotoxin B by resonant acoustic profiling [J]. Anal Chem, 2009, 81(10): 3896- 3902

[34] Xu Z,Shi L, Zhang C, et al. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying Staphylococcus aureus in a hospital in South China [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13: 980-984

[35] Xu Z, Shi L, Alam MJ, et al. Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004 [J].Fems Microbiol Lett. 2008, 278:223-230

[36] Xu Z, Li L, Alam MJ, et al. First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Curr Microbiol. 2008, 57: 264-268

[37] Xu Z, Li L, Shirtliff M E, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in Southern China [J]. Journal of clinical microbiology, 2009, 47(1): 230-234

[38] Xu Z, Li L, Shirtliff M E, et al. First report of class 2 integron in clinical Enterococcus faecalis and class 1 integron in Enterococcus faecium in South China [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2010, 68: 315-317

[39] Xu Z, Li L, Shirtliff M E, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in southern China,2001-2006 [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2011, 17(5): 714-718

现代食品科技