

金黄色葡萄球菌耐药性与生物被膜能力的鉴定

桂中玉¹, 李琳¹, 李冰¹, 徐振波^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 美国马里兰大学微生物病理系, 巴尔的摩 MD21201)

摘要: 本文选择常见的典型食源性微生物金黄色葡萄球菌, 从食品微生物安全角度出发, 对 127 株葡萄球菌的菌株特性、耐药性与生物被膜生长能力进行研究, 包括菌株生化鉴定; PCR 扩增葡萄球菌特异 16S rRNA 与金葡菌特异 femA 基因, 通过对耐药基因 mecA 和 orfX 检测确定菌株的耐药特性; 最后, 运用结晶紫染色法进行生物被膜能力检测。127 株菌株包括 119 株金葡菌 (均携带 16S rRNA 与 femA) 与 8 株凝固酶阴性葡萄球菌 8 株 (仅携带 16S rRNA)。119 株金葡菌中, 107 株携带 mecA 基因与 orfX 基因, 为耐甲氧西林金葡菌 (MRSA); 8 株凝固酶阴性葡萄球菌中, 均携带 mecA 基因。所有菌株均能生成生物被膜, 其中能形成强、中等与弱粘附生物被膜能力菌株分别有 5 (3.9%)、47 (37.0%) 和 75 (59.1%) 株。金葡菌中耐药性与生物被膜较为普遍, 由于食源性微生物形成生物被膜后, 具有逃逸常规消毒和杀菌手段的能力, 成为食品安全中的潜在隐患。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 细菌生物被膜; 食品生物危害; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2014)3-69-75

Investigation of Antibiotic Resistance and Biofilm-forming Ability in *Staphylococcus aureus*

GUI Zhong-yu¹, LI Lin¹, LI Bing¹, XU Zhen-bo^{1,2}

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

(2. Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland, Baltimore 21201, United States)

Abstract: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has been long recognized as a common food-borne pathogen in food safety. To study their individuality, drug resistance and biofilm-forming capacity, a total of 127 *Staphylococci* strains were subject to the investigation. Preliminary identification of *Staphylococcus aureus* was conducted with a rapid confirmatory latex agglutination test kit and API staph test strips. *S. aureus* was further confirmed with the detection of specific 16S rRNA and femA genes by PCR. The molecular method was also used for amplification of mecA and orfX elements to identify methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA). The biofilm-forming capacity of 127 clinical isolates of *S. aureus* was tested using a polystyrene 96-well plate format and crystal violet staining. In this experiment, 127 staphylococci were isolated, in which 107 strains were MRSA, 12 strains belonged to methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and 6 strains contributed to methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS). All staphylococci isolates formed biofilms, and 75 strains (59.1%) belonged to the weak adhesive group. The molecular method was more accurate and rapid for the identification of strains. The majority of the strains formed weak adhesive biofilms and there was no significant relationship between the genotype of drug resistance and biofilm formation ability.

Key words: *Staphylococcus aureus*; antibiotic resistance; bacterial biofilm; food bio-hazard; food safety

近年来, 由致病性微生物感染了食物而引起的食品安全问题正受到广泛关注。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 金葡菌) 作为一种典型的致病菌, 是最重要的食源性革兰氏阳性菌, 由于其在自

收稿日期: 2013-10-26

基金项目: 国家 973 计划项目 “(2012CB720800); 国家自然科学基金青年基金项目 (31201362); 中央高校基本科研业务费面上项目 (2012ZM0060)

作者简介: 桂中玉 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性微生物安全控制与致毒机理研究

通讯作者: 徐振波 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性微生物安全控制与致毒机理研究

然界中无处不在, 因而食品受其污染的机会很多。由金葡菌引发的食物中毒事件在各国都是屡见不鲜的。抗生素在畜牧业的滥用成为近年来食品安全的热门话题, 随之出现的微生物耐药性日趋严重。耐药性金葡菌近年来被大量地在院内、畜牧业及食品中发现^[1-3], 为细菌性感染疾病的治疗提出了严重的挑战。带有 mecA 耐药基因的金葡菌 (耐甲氧西林金葡菌 MRSA) 对所有 β 内酰胺酶类在内的多种抗生素耐药, 使其在院内感染、食品安全及生物恐怖主义等领域引起了广泛的担忧, 因此, 对其的监控成为重中之重的问题^[1]。

相关研究显示,自然界中的大部分微生物以生物被膜(bacterial biofilm, BF)的形式存在。细菌生物被膜是细菌相互粘附或粘附于惰性或活性实体表面,在繁殖分化的过程中,同时分泌多糖基质(藻酸盐多糖)、纤维蛋白、脂质蛋白等,将其自身包绕其中而形成一种大量微生物群体聚集的膜状结构^[4]。以生物被膜状态存在金葡菌能够抵抗多种不良的生存环境,导致在食品生产及加工环境中,常规的清洗与消毒根本无法完全清除。更复杂的是,以生物被膜状态存在的金葡菌使得耐药状况在食品领域广泛传播,从而引起严重恐慌。生物被膜给食品安全与卫生增加了新的难题。据估计,65%以上的人类细菌性感染是由生物被膜引起的^[5]。作为一个重要的毒力决定因子,生物被膜严重威胁者食品安全与人类健康^[6]。

本研究通过对127株样本菌进行生化鉴定,随后对菌株特异性基因、关键耐药基因与调控因子进行检测,最后对其生物被膜形成能力进行定量分析,可为当前流行金葡菌的生物被膜生长状况提供数据支持,并为进一步研究其生理生化特征及控制生物被膜的形成提供理论和技术支持。

1 材料

1.1 受试菌株

本实验共检测了127株葡萄球菌,来自于包括痰、尿、血及分泌物等不同样本,经常规生化鉴定(M43葡萄球菌乳胶凝集试剂盒)及staph API条确定的金葡菌共119株,用基因检测法鉴定出MRSA 107株。甲氧西林敏感型金葡菌 MSSA 质控菌株 ATCC25923,为本实验室保存。

1.2 PCR 引物

葡萄球菌属特异性16S rRNA基因、金葡菌菌株特异性femA基因、重要耐药基因mecA及关键调控因子orfX基因的各引物由江苏南京金斯瑞生物工程有限公司合成,见表1。

1.3 主要试剂与仪器

2×Taq PCR MasterMix(包含400 μmol/L的dNTPs,0.1 U的Taq DNA聚合酶,3 mmol/L的MgCl₂,20 mmol/L的Tris-HCl,100 mmol/L的KCl等)、DNA Marker、Tritonx-100、基因组提取试剂盒、溶菌酶,广东东盛生物科技有限公司;西班牙琼脂糖(GENE Company Ltd);乙二胺四乙酸(EDTA,国药集团化学

试剂有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris),天津科密化学试剂有限公司;血琼脂平皿、胰酶大豆肉汤培养基TSB,广东环凯微生物有限公司;葡萄球菌乳胶凝集试剂盒及staph API条,Microgen Bioproducts Ltd;PCR扩增仪,Eppendorf公司;GELDOC-200凝胶成像系统,美国BIO-RAD公司;酶标仪,SUNRISE公司。

表1 鉴定MRSA的引物

Table 1 Description of the primers used for amplifying 16S rRNA, femA, mecA and orfX genes

目标产物	引物设计	引物序列	退火温度/℃	扩增产物大小/bp
16S rRNA	C1	GATGAGTGCTAAGTGTTAGG	48	542
	C2	TCTACGATTACTAGCGATTC		
femA	F1	AAAGCTTGCTGAAGGTTATG	48	823
	F2	TTCTTCTTGTAGACGTTTAC		
mecA	M1	GGCATCGTTCCAAAGAATGT	48	384
	M2	CCATCTTCATGTTGGAGCTTT		
orfX	O1	ACCACAATCMACAGTCATT	50	212
	O2	CCCGCATCATTTGATGTG		

2 实验方法

2.1 常规鉴定

2.1.1 M43 葡萄球菌乳胶凝集检测

初步分离平板(5%的血平板),经36±1℃培养18~24 h。轻轻摇匀葡萄球菌乳胶凝集试剂盒试剂,滴1滴测试试剂于检测板的一个反应环内。随后用接种环从选择性分离平板上挑取可疑菌落,与反应环内的乳胶试剂混合并混匀。再用1支干净的搅拌棒将混匀液在整个反应环内涂布均匀。轻摇检测板,在2 min内观察凝集结果。记录结果。在2 min内出现凝集,表明测试菌落为金黄色葡萄球菌,如不出现凝集,表明测试菌落即不是金黄色葡萄球菌,也不是其它具有凝固酶/A蛋白的葡萄球菌。

2.1.2 Staph API 条鉴定

挑取初步分离平板(5%的血平板),经36±1℃培养18~24 h后,选取1个金黄色葡萄球菌的单菌落放入悬浮液中,乳化震荡均匀。用无菌管取3~4滴(约100 μL)细菌悬浮液加入到微孔测试条的每个孔中。转移一滴细菌悬浮液到非选择性分离培养基纯化板上检测纯度,36±1℃下有氧培养18~24 h。孵育完成后,用3~4滴矿物油覆盖10、11号孔。微孔测试条顶部封上粘附带,36±1℃孵育18~24 h。移除粘附带,添加一滴PYR试剂至12号孔,观察颜色变化,读取测试

结果。有深粉红/红色物质生成极为阳性。

2.2 基因鉴定

2.2.1 基因组 DNA 的提取

对 127 株金葡菌进行基因组 DNA 提取, 其方法参照试剂盒说明书, 简述如下: 取 2 mL 处于对数生长期菌液, 置于 1.5 mL 无菌离心管中, 12000 r/min 离心 1 min 后弃上清并加入 180 μ L 缓冲液 (20 mM Tris、pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton100) 和终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶(混匀后 37 $^{\circ}$ C 处理 60 min), 随后分别加入 4 μ L RNase A (100 mg/mL) 溶液 (室温 5 min)、20 μ L 蛋白酶 K 溶液 (55 $^{\circ}$ C, 30 min)、220 μ L 裂解液 MS (振荡至形成均一悬浮液, 65 $^{\circ}$ C 15 min 至溶液变清亮) 与 220 μ L 无水乙醇。离心并弃滤液后, 分别通过蛋白液 PS 与漂洗液 PE 洗涤, 以彻底去除纯化柱中残留的液体。最终通过洗脱纯化柱中的 DNA, 即获得高纯度基因组 DNA。

2.2.2 葡萄球菌属特异性基因 16S rRNA 鉴定

PCR 检测葡萄球菌特异性基因 16S rRNA (表 1)。终体积 25 μ L 体系中, 2 \times Taq PCR MasterMix 酶 12.5 μ L, 浓度为 10 pmol/ μ L 的上下游引物 C1/C2 各 1 μ L, 模板 DNA 为 1 μ L, 补纯水至总反应体积 25 μ L。反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, Tm 温度下退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。产物电泳, 并在凝胶成像系统观察结果并保存。

2.2.3 金葡萄菌株特异性基因 femA 鉴定

PCR 检测金葡萄特异性基因 femA (表 1)。终体积 25 μ L 体系中, 2 \times Taq PCR MasterMix 酶 12.5 μ L, 浓度为 10 pmol/ μ L 的上下游引物 F1/F2 各 1.5 μ L, 模板 DNA 为 1 μ L, 补纯水至总反应体积 25 μ L。扩增反应条件同上。

2.2.4 耐药基因 mecA 鉴定

PCR 检测耐药基因 mecA (表 1)。终体积 25 μ L 体系中, 12.5 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix 酶, 浓度为 10 pmol/ μ L 的上下游引物 M1/M2 各 1 μ L, 模板 DNA 为 1 μ L, 补纯水至总反应体积 25 μ L。扩增反应条件同上。

2.2.5 调控因子 orfX 鉴定

对 127 株葡萄球菌的开放阅读框 orfX 基因进行 PCR 检测。引物为自行设计 (表 1)。PCR 技术扩增反应体系 25 μ L, 内含 2 \times Taq PCR MasterMix 物 12.5 μ L, 浓度为 10 pmol/ μ L 的上下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 为 1 μ L, 补纯水至总反应体积 25 μ L。扩增反应条件同上。

2.3 生物被膜生成能力检测

生物被膜形成能力测定采用 96 孔板培养、结晶紫染色法^[7]。取过夜培养的菌液稀释 100 倍放至新鲜的 TSB 中再培养 2 h 以获得对数生长期的细菌, 在 600 nm 光密度下稀释培养液浓度至 0.001。将稀释好后的培养液 200 μ L/孔加入到无菌 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。培养结束后, 用生理盐水洗涤 3 次, 以除去杂质和浮游菌; 再用 0.01% 的无菌结晶紫染色 15 min。染色结束后, 用无菌水洗涤两次。最后采用 95% 的乙醇将附着的结晶紫洗脱下来。移取 125 μ L 洗脱液于新的酶标板, 于 540 nm 处测定吸光值。此方法测定了经重复洗涤后粘附于底部的细菌细胞保留的结晶紫染色液。其中每个样品需要在一次实验中重复 8 个孔, 而每次实验需要重复 3 次。采用 200 μ L 的培养基作为空白对照。

OD 值可反映生物被膜与接触表面粘附的牢靠程度, 依据临界 OD 值(OD_c 等于空白孔的平均 OD 值加上其 3 倍标准差而得到的 OD 值)可对生物被膜分类: $OD \leq OD_c$ 为不粘附(0), $OD_c < OD \leq 2OD_c$ 为弱粘附(+), $2OD_c < OD \leq 4OD_c$ 为中等粘附(++), $OD > 4OD_c$ 为强粘附(+++)^[8]。可表示成相对形成单元 $RU = OD/OD_c$ 形式, 即 $RU \leq 1$ 为不粘附(0), $1 < RU \leq 2$ 为弱粘附(+), $2 < RU \leq 4$ 为中等粘附(++), $RU > 4$ 为强粘附(+++)。

2.4 生物被膜生成能力数据分析

生物被膜能力形成的数据分析采用 SPSS 软件, 对于组间的比较, χ^2 分析用来测定生物被膜形成不同百分比之间是否具有显著性的数据差异。

3 结果与讨论

当前, 由金葡菌引起的细菌性食物中毒是食品微生物安全的重要问题; 同时, 其在食品行业中的危害, 不仅局限在食品本身。随着近年来耐药性及致毒性金葡菌被大量地在畜牧业及食品中发现, 金葡菌不但对食品, 同时对所有从事食品加工和处理人员, 也是一个潜在的危险因素^[9-10]; 成为近年来社区来源耐药性金葡菌分离率不断增高的可能原因之一。

3.1 常规检测分析

经 M43 葡萄球菌乳胶凝集试剂盒测试, 127 株样本菌均在 2 min 内出现凝集现象, 表明, 127 株样本的测试菌落为金葡菌。经 Staph API 条测试实验, 119 株样本菌均在测试中形成深红色圈, 因此初步判断其均为金葡菌。

3.2 葡萄球菌菌株特异性基因分析

对经常规鉴定的金葡菌进行葡萄球菌属特异性 16S rRNA 基因检测, 实验结果显示, 127 株样本菌均有一条 542 bp 的条带, 即为 16S rRNA 阳性, 表明这 127 株样本菌全部为葡萄球菌。

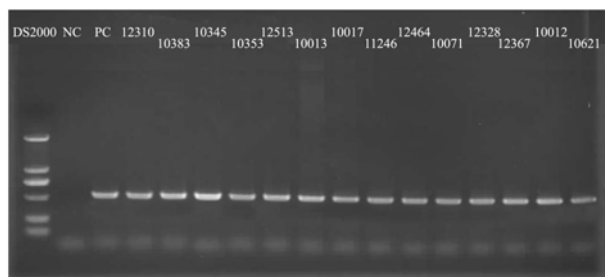


图 1 PCR 检测 16S rRNA 基因

Fig.1 Identification of 16S rRNA gene using PCR

3.3 金黄色葡萄球菌特异性基因分析

对 127 株葡萄球菌进行金葡菌属特异性 femA 基因检测, 实验结果显示, 127 株样本菌中有 119 株含有 823 bp 的条带, 即该 119 株为 16S rRNA、femA 基因阳性, 表明这 119 株样本菌全部为金黄色葡萄球菌。又经形态学与染色法鉴定为金葡菌的菌株 127 株, 但基因鉴定为金葡菌 (同时含有 16S rRNA 及 femA 基因) 只有 119 株, 结果显示, 菌株的表型与基因型存在一定的差异, 符合率为 93.7% (119/127)。

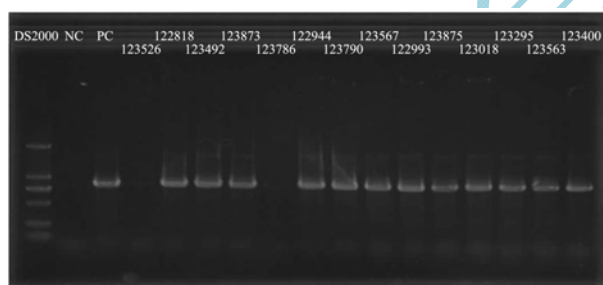


图 2 PCR 检测 femA 基因

Fig.2 Identification of femA gene using PCR

3.4 耐药基因 mecA 分析

按照 2004 年版 NCCLS 建议, 凡检测出耐甲氧西林 mecA 基因或即可确定为 MRSA 和 MRCNS, 不以菌株表型或药敏实验结果为准, 而以 mecA 基因存在与否为准。因此, 对关键耐药基因 mecA 的检测, 在葡萄球菌的鉴定中显得尤为重要。对 127 株葡萄球菌进行耐药基因 mecA 检测, 结果显示, 127 株样本菌中有 113 株含有 823 bp 的条带, 即该 113 株为 16S rRNA、mecA 基因阳性, 表明这 113 株样本菌全部为耐甲氧西林葡萄球菌, 其中包括 107 株金葡菌及 6 株

非金葡菌 (凝固酶阴性葡萄球菌), 即 127 株样本菌中有 107 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA), 12 株甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA), 6 株耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (methicillin-resistance coagulase-negative staphylococci, MRCNS), 2 株甲氧西林敏感性葡萄球菌 (methicillin-susceptible staphylococci, MSS)。

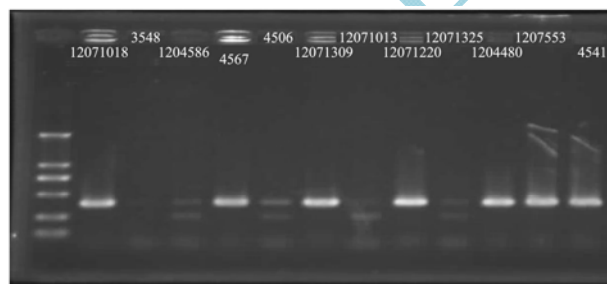


图 3 PCR 检测 mecA 基因

Fig.3 Identification of mecA gene using PCR

3.5 调控因子 orfX 分析

金葡菌的耐药表型让细菌感染难以治疗, 尽管 MSSA 和 MRSA 在感染率上没有显著差异, 但研究表明, 感染 MRSA 的病人呈多重耐药特性, 其死亡率更高^[11]。因此, MRSA 的快速检测鉴定对从食品领域防止其传播及接触人员的感染具有重要的意义。

对上述 119 株金葡菌进行耐药基因组岛特异基因 orfX 检测, 电泳鉴定结果显示, 107 株菌均携带 orfX 基因 (图 4), 可判断为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA), 在表型上对所有 β-内酰胺类抗生素耐药。经 16S rRNA、femA、mecA 基因鉴定出 MRSA 107 株, 与经耐药基因组岛特异 orfX 基因鉴定结果一致, 经基因方法鉴定结果更加快速、精确。

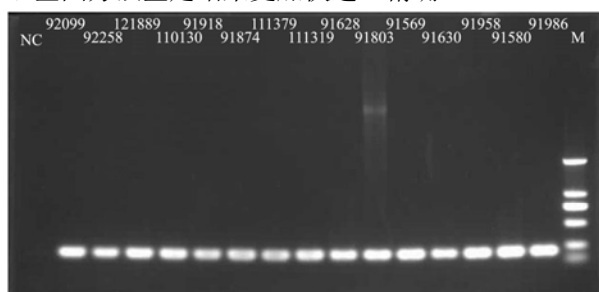


图 4 PCR 检测 orfX 基因

Fig.4 Identification of orfX gene using PCR

3.6 生物被膜形成能力检测结果分析

在检测的 127 株细菌中, 所有样本菌中, 生物被膜形成相对单元 RU 值是处于 0 到 1 之间 0 株; 处于

1 到 2 之间 75 株, 处于 2 到 4 之间 47 株, 处于 1 到 2 之间 75 株, $RU > 4$ 的菌株 5 株 (表 2)。即所有检测菌株均能生成生物被膜, 其中能形成强生物被膜能力菌株有 5 株, 占 3.9%; 能形成中等生物被膜能力菌株有 47 株, 占 37.0%; 75 株细菌只能生成弱粘附生物被膜, 占到 59.1%。一半 (10/20) MSSA 生成至少中等粘附的生物被膜, 39.3%(42/107) MRSA 生成至少中等粘附的生物被膜, 统计学分析显示, 两种菌株的生物被膜形成能力没有显著性差异, 可见, 细菌的耐药状况与生物被膜形成能力没有显著相关性, 尽管据报道被包裹在生物被膜中的细菌较浮游菌抗生素耐性会提高 10~1000 倍。

生物被膜的形成使得微生物易感染宿主并且存活下来。微生物以生物被膜形式存在, 在食品加工过程中长期被忽视了, 直到最近几年在乳品和肉制品加工上才出现相关的报道^[12~13]。生物被膜的防治一直是

食品工业的一大难题。由于金黄色葡萄球菌在自然界的广泛分布, 在食品加工过程中, 其在不同加工环节都有可能形成生物被膜, 被胞外多糖蛋白复合物包围的金黄色葡萄球菌比浮游生长的细菌对杀菌具有更强的抵抗能力, 在食品加工中进行普通的消毒杀菌对除去生物被膜作用不明显^[14]。要杀死生物被膜中的细菌就不得不提高杀菌温度或增加杀菌剂量, 这样在杀死生物被膜细菌的同时也降低了食品的营养价值, 杀菌剂残留也可能对人体产生不良影响。此次调查研究为金黄色葡萄球菌生物膜生成能力提供了重要信息, 并探讨了甲氧西林耐药和生物膜形成的关系。而了解菌株形成生物膜的能力是了解金黄色葡萄球菌生物膜形成机制的第一步, 对生物被膜生成能力的普查, 利于我们了解当前细菌生物被膜生成状况, 对其进行预防和控制及保证食品安全, 具有重要的现实意义。

表 2 生物被膜能力三组平均值

Table 2 The average array of biofilm forming ability

样本菌	RU	表示格式	分类	菌株鉴定	样本菌	RU	表示格式	分类	菌株鉴定
120866	4.75±1.77	+++	强	MRSA	1204207	1.68±0.31	+	弱	MRSA
120608	4.38±1.04	+++	强	MRSA	92182	1.66±0.15	+	弱	MRSA
120844	3.93±0.62	++	中等	MRSA	123425	1.65±0.57	+	弱	MRSA
92091	3.69±0.81	++	中等	MRSA	11450	1.65±0.13	+	弱	MRSA
120334	3.33±0.67	++	中等	MRSA	122944	1.63±0.23	+	弱	MRSA
120184	3.23±0.23	++	中等	MRSA	92258	1.62±0.11	+	弱	MRSA
11359	3.12±1.22	++	中等	MRSA	123614	1.61±0.33	+	弱	MRSA
11984	3.08±0.60	++	中等	MRSA	120778	1.60±0.35	+	弱	MRSA
10621	3.01±0.28	++	中等	MRSA	11242	1.59±0.50	+	弱	MRSA
122818	2.97±1.70	++	中等	MRSA	11124	1.59±0.33	+	弱	MRSA
120620	2.89±1.26	++	中等	MRSA	120563	1.59±0.26	+	弱	MRSA
123563	2.84±0.98	++	中等	MRSA	11403	1.53±0.39	+	弱	MRSA
12513	2.80±0.40	++	中等	MRSA	122967	1.52±0.32	+	弱	MRSA
10008	2.73±1.44	++	中等	MRSA	11151	1.52±0.23	+	弱	MRSA
10023	2.71±0.65	++	中等	MRSA	121871	1.50±0.42	+	弱	MRSA
1204553	2.70±0.71	++	中等	MRSA	123240	1.50±0.35	+	弱	MRSA
123295	2.69±1.36	++	中等	MRSA	92099	1.50±0.34	+	弱	MRSA
120841	2.61±0.31	++	中等	MRSA	92192	1.50±0.27	+	弱	MRSA
12464	2.59±1.57	++	中等	MRSA	121940	1.48±0.41	+	弱	MRSA
10854	2.58±0.82	++	中等	MRSA	120298	1.48±0.34	+	弱	MRSA
123635	2.58±0.31	++	中等	MRSA	4541	1.47±0.47	+	弱	MRSA
123875	2.57±1.19	++	中等	MRSA	123114	1.45±0.31	+	弱	MRSA
121782	2.49±1.15	++	中等	MRSA	120560	1.45±0.27	+	弱	MRSA
123337	2.47±0.81	++	中等	MRSA	120444	1.45±0.22	+	弱	MRSA
123873	2.36±0.79	++	中等	MRSA	11997	1.45±0.17	+	弱	MRSA

转下页

接上页									
10012	2.34±0.70	++	中等	MRSA	12071309	1.44±0.26	+	弱	MRSA
11887	2.34±0.70	++	中等	MRSA	10864	1.44±0.14	+	弱	MRSA
123018	2.29±0.97	++	中等	MRSA	1204160	1.43±0.35	+	弱	MRSA
12084	2.28±1.08	++	中等	MRSA	11580	1.42±0.20	+	弱	MRSA
123313	2.28±1.06	++	中等	MRSA	1112117	1.37±0.44	+	弱	MRSA
12019	2.22±0.81	++	中等	MRSA	92152	1.37±0.13	+	弱	MRSA
12310	2.18±0.24	++	中等	MRSA	1203257	1.35±0.49	+	弱	MRSA
10013	2.15±0.74	++	中等	MRSA	10383	1.34±0.37	+	弱	MRSA
12328	2.15±0.70	++	中等	MRSA	10379	1.33±0.29	+	弱	MRSA
12057	2.13±1.12	++	中等	MRSA	1111187	1.33±0.26	+	弱	MRSA
12071220	2.12±0.82	++	中等	MRSA	11247	1.32±0.31	+	弱	MRSA
123400	2.12±0.76	++	中等	MRSA	12071018	1.30±0.22	+	弱	MRSA
121667	2.10±0.29	++	中等	MRSA	1204480	1.28±0.43	+	弱	MRSA
120171	2.05±0.14	++	中等	MRSA	1204125	1.23±0.23	+	弱	MRSA
120157	2.02±0.42	++	中等	MRSA	11900	1.20±0.25	+	弱	MRSA
120077	2.01±0.55	++	中等	MRSA	1111309	1.20±0.18	+	弱	MRSA
123492	2.00±0.58	++	中等	MRSA	12367	1.17±0.16	+	弱	MRSA
11433	1.98±0.90	+	弱	MRSA	11270	1.14±0.22	+	弱	MRSA
122993	1.98±0.53	+	弱	MRSA	12071013	8.17±0.26	+++	强	MSSA
1204130	1.97±0.54	+	弱	MRSA	1204151	5.62±0.94	+++	强	MSSA
120551	1.97±0.25	+	弱	MRSA	1204522	3.04±1.12	++	中等	MSSA
123310	1.95±0.35	+	弱	MRSA	10501	2.62±1.00	++	中等	MSSA
11260	1.92±0.66	+	弱	MRSA	1204189	2.15±0.94	++	中等	MSSA
113319	1.92±0.19	+	弱	MRSA	12071326	1.84±0.87	+	弱	MSSA
4567	1.88±0.27	+	弱	MRSA	10345	1.71±0.04	+	弱	MSSA
10713	1.86±0.68	+	弱	MRSA	4506	1.68±0.45	+	弱	MSSA
10071	1.86±0.52	+	弱	MRSA	3548	1.59±0.42	+	弱	MSSA
10017	1.84±0.81	+	弱	MRSA	1204347	1.46±0.27	+	弱	MSSA
1204244	1.83±0.49	+	弱	MRSA	1112149	1.32±0.31	+	弱	MSSA
10103	1.83±0.35	+	弱	MRSA	1204586	1.25±0.17	+	弱	MSSA
11929	1.81±0.34	+	弱	MRSA	123786	3.69±1.02	++	中等	MRCNS
120789	1.77±0.29	+	弱	MRSA	10066	3.10±1.14	++	中等	MRCNS
12353	1.76±0.50	+	弱	MRSA	12361	2.10±0.50	++	中等	MRCNS
92132	1.76±0.20	+	弱	MRSA	123526	1.60±0.41	++	中等	MRCNS
10853	1.73±0.56	+	弱	MRSA	11298	1.49±0.17	+	弱	MRCNS
92318	1.73±0.46	+	弱	MRSA	123151	1.15±0.12	+	弱	MRCNS
123569	1.73±0.35	+	弱	MRSA	10694	11.89±1.14	+++	强	MSS
123790	1.70±0.32	+	弱	MRSA	10300	1.23±0.35	+	弱	MSS
11175	1.69±0.44	+	弱	MRSA					

4 结论

本文通过对 127 株葡萄球菌的菌株特性、耐药性与生物被膜生长能力进行检测,结果显示,在典型的食源性微生物金葡菌中,耐药性较为普遍,其中 90.0%

(107/119) 为耐药性金葡菌,该类菌株对所有 β -内酰胺类抗生素耐药。随着抗生素在畜牧业中的滥用,造成的安全性问题已不局限于动物性食品中的残留抗生素,而应扩展至由此带来的微生物耐药性问题。同时,葡萄球菌中普遍存在生物被膜生长能力,其中 40%以

上带有强或中等被膜形成能力; 由于食源性微生物形成生物被膜后, 具有逃逸常规消毒和杀菌手段的能力, 同时更易于形成毒素, 由此成为食品安全中的潜在隐患。

参考文献

- [1] Pesavento G, Ducci B, Comodo N, et al. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Food Control*, 2007, 18: 196-200
- [2] Laura B R, Luciana R S, Vinicius Z C, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *E coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry slaughterhouse [J]. *Brazilian J of Microbiol.*, 2010, 41: 1082-1085
- [3] Androletti O, Budka H, Buncic S, et al. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard [J]. *EFSA J.*, 2008, 765: 2-87
- [4] Costerton J W. Introduction to biofilm [J]. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 1999, 11: 217-221
- [5] Costerton J W, Stewart P S, Creenberg E P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284: 1318-1322
- [6] Pesavento G, Ducci B, Comodo N, et al. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Food Control*, 2007, 18: 196-200
- [7] Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections [J]. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, 25: 773-781
- [8] Laura B R, Luciana R S, Vinicius Z C, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *E coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry slaughterhouse [J]. *Brazilian J. of Microbiol.*, 2010, 41: 1082-1085
- [9] Androletti O, Budka H, Buncic S, et al. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard [J]. *EFSA J.*, 2008, 765: 2-87
- [10] De Boer E, Zwartkruis-Nahuis J T M, Wit B, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 134: 52-56
- [11] Melzer M, Eykyn S J, Gransden, et al. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia [J]. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 37: 1453-1460
- [12] Knight G C, Nicol R S, McMeekin T A. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 93: 305-318
- [13] Gunduz G T, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 89: 29-336
- [14] Mah T F, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents [J]. *Trends in Microbiol.*, 2001, 9: 34-39