

# 食源性微生物 MRSA 及其检测方法在食品安全中的研究进展

邓阳<sup>1</sup>, 刘晓晨<sup>1</sup>, 李冰<sup>1</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 徐振波<sup>1, 2</sup>

(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:** 食品安全在世界卫生组织的定义是指所有食品中有毒、有害物质对人体健康影响的公共卫生问题。2008年“三聚氰胺”事件后, 在近几年的全国两会上, 食品安全问题连续成为焦点话题; 而同期全国人大常委会通过的《食品安全法》, 更显示了食品安全的严重与令人担忧, 其监测与控制显得迫在眉睫。作为典型的食源性微生物, 金葡菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 其新型的耐药特点显示了细菌耐药性的发展和进化可能是由于大量抗生素在畜牧业中的滥用而造成的。由于抗菌药物的研制周期跟不上耐药性出现的速度, 使得细菌治疗面临越来越严峻的考验, 甚至出现无药可用的情况, 严重威胁人类健康。本文结合食品安全抗生素滥用问题与最近出现的超级细菌耐药问题, 根据在相关领域多年的研究数据, 对常见的食源性微生物MRSA及其检测方法在食品安全中的研究进展进行综述。

**关键词:** MRSA检测; 食品安全; 食源性微生物

文章编号: 1673-9078(2015)1-259-266

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.044

## Review of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Its Detection in Food Safety

DENG Yang<sup>1</sup>, LIU Xiao-chen<sup>1</sup>, LI Bing<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, XU Zhen-bo<sup>1,2</sup>

(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, USA)

**Abstract:** According to the World Health Organization, food security is a public health issue worldwide due to the presence of toxic and hazardous substances in food. After the melamine-tainted milk scandal in China in 2008, food security was a hot topic at subsequent sessions of the National People's Congress and Chinese People's Consultative Conference. At the same time, the Standing Committee of the National People's Congress passed the "Food Safety Law," which states that the situation of food safety in China is serious and worrisome. Therefore, strengthening the monitoring and control procedures for food safety is an immediate concern. *Staphylococcus aureus*, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is a typical food-borne microorganism, exhibiting new drug-resistant characteristics, indicating that the development and evolution of bacterial drug resistance might be due to the misuse of antibiotics in livestock. Since the rate of developing new antibiotics cannot keep pace with the emergence of drug-resistance, treatment of bacterial infection is becoming more challenging. In situations where no effective antibiotics are available, human health is exposed to a serious threat. Combining the issues of food safety arising from antibiotic misuse and the recent drug resistance of "superbugs," the authors present a review of research progress on the common food-borne microorganism MRSA and its detection methods for food safety.

**Key words:** detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; food safety; food-borne microorganisms

### 食品安全在世界卫生组织 (World Health

Organization, WHO) 的定义是指所有食品中有毒、有害

收稿日期: 2014-04-17  
基金项目: 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: 邓阳 (1986-), 男, 博士, 主要研究方向为食源性微生物耐药性与毒性的快速检测与鉴定等

通讯作者: 徐振波 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为食源性微生物的产生物被膜行为

物质对人体健康影响的公共卫生问题。2008年“三聚氰胺”事件后, 在近几年的全国两会上, 食品安全问题连续成为焦点话题; 而同期全国人大常委会通过的《食品安全法》, 更显示出食品安全问题的日益严重, 其监测与控制也显得迫在眉睫; 两会上的多份提议均指向添加剂与抗生素问题, 成为最关注的热点话题之一。食品安全研究的对象是食品中有毒害的物质, 传统上

这种有毒物质被狭义理解为能引起急性中毒和症状的食源性疾病,如食物中毒、肠道传染病和寄生虫病等;但抗生素和添加剂等引起的长期与慢性毒害,则一直被忽视。

超时、超量、不对症和未严格规范使用抗生素等现象的泛滥,使我国成为全球抗生素滥用最严重的国家,2002年,我国医用抗生素市场规模达345亿元人民币,而据估计,近年我国年产抗生素原料与出口约为21和3万t,产量和出口量均位居世界第一;这个数字在2009年分别为14.7和2.47万t。在人均年消费量方面,我国在138克左右,是美国的10倍(仅13g),在全球位于第一。在我国的消费药品中,抗生素在前100位占47%(欧美国家仅为10%),在前十位中则占一半;美国与英国抗生素使用率为22%与25%,我国则达67~82%<sup>[1]</sup>。据卫生部全国细菌耐药监测结果显示,2006~2007年抗生素使用率高达74%,而其中80%属于滥用。WHO调查显示,我国住院患者抗生素使用率高达80%,其中使用广谱抗生素和联合使用两种以上抗生素的占58%,远远高于30%的国际水平;门诊感冒患者约有75%应用抗生素,外科手术则高达95%<sup>[2]</sup>。在畜牧养殖业中使用量更大,根据2001年WHO统计,全球每年消耗的抗生素总量中,有90%被用于食用动物,每年约有12000t和900t抗生素分别被用于食用动物的饲料添加剂和治疗用药。我国每年有6000吨抗生素用于饲料添加剂,占全球抗生素饲料添加剂使用量的50%<sup>[3]</sup>。

在畜牧业和养殖业的动物食品中,无处不在的残留抗生素为微生物的生存与进化提供了抗生素的选择压力,成为耐药菌产生的重要原因<sup>[4]</sup>。长时间大量使用抗生素,导致致病细菌耐药性越来越强,治疗时只能加大剂量,形成恶性循环;进入环境中的抗生素将通过吸附、水解、光解和微生物降解等生物转化过程产生生态毒性,如抑制环境中微生物群落的生长从而降低土壤肥力,影响水生生物和昆虫的正常发育及生长,通过食物链污染食品,干扰人类的各项生理功能,最重要的是低剂量的抗生素环境极容易滋生多种抗生素耐药菌并传播给人类,威胁人类健康<sup>[5]</sup>。由此动物体内抗生素残留得到积累而无法有效降解,形成“有抗食品”,并直接传给人类,对人类健康形成威胁。

## 1 食品安全与超级细菌

长期以来,抗生素除了广泛用于人类的疾病治疗外,也被大量用于动物疾病治疗及以亚治疗剂量作为动物饲料添加剂预防疾病和促进动物生长。每年有近万吨抗生素用于饲料添加剂,占全球抗生素饲料添加剂使用量的50%<sup>[6~7]</sup>。随着抗生素的广泛大量使用及由

此带来的抗性菌株的选择性筛选,从而产生一系列耐药性强的致病株严重威胁人类健康。一方面,细菌耐药性可通过食物链转移到人类,致使人们食用受到病原微生物污染的食品造成病源性疾病及感染,已成为全球食品安全和公共健康最为突出和关注的问题之一;另一方面,由于病原微生物抵御外界环境压力变化能力的提高,常规灭菌技术和治疗手段已经或者正在丧失应有的效用。

### 1.1 超级细菌

2010年《柳叶刀》杂志首次报道南亚的“超级细菌”,该菌携带具有泛耐药性NDM-1基因,能对绝大多数抗生素耐药<sup>[8]</sup>;经进一步研究发现,英国卫生部和美国疾控中心均提出携带NDM-1基因的细菌具有大范围传播和感染能力。目前,NDM-1耐药菌在印度肠细菌感染中达1%~3%;在欧洲、非洲和澳大利亚等地亦已有报道<sup>[9~13]</sup>;我国在2011年首次发现该类耐药细菌<sup>[14]</sup>,可见其感染范围和感染率呈扩增趋势。耐药性不改变致病菌的性状,但可让患者在感染后变得无药可治。临床微生物学传统定义的“超级细菌”包括临床上出现的多种耐药菌,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、抗万古霉素肠球菌(VRE)以及耐多药肺炎链球菌(MDRSP)等。与NDM-1耐药菌相比,这些传统的“超级细菌”检出率更高,在感染性疾病中更多见;其中,MRSA是医院内最常见的病原菌之一,具有高发病率。据美国CDC统计,每年约数十万人因感染MRSA而住院治疗,院内感染的MRSA分离率已高达80%以上,其多重耐药的特性不但增加了治疗的复杂性和难度,也增加了抗生素的消耗量和医疗费用<sup>[15~16]</sup>。

### 1.2 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是主要的食源性微生物,由其引起的食物中毒事件在革兰氏阳性菌中高居首位;据统计,在美国,由金葡菌引起的食物中毒占33%,仅次于大肠杆菌;在1983~1997年间,每年约18.5万人发生葡萄球菌中毒,其中1750人住院,总医疗费用达15亿美元<sup>[3,14]</sup>。金葡菌在加拿大占细菌性食物中毒的45%,而在某些欧洲国家如匈牙利、芬兰等则占50%以上。在日本,1980~1999年间共超过2500起葡萄球菌中毒报道,受感染人数约6万人;而2000年因污染金葡菌引起的“雪印奶粉”事件则超过14000人受感染<sup>[7,17]</sup>。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。

金葡菌也是典型的耐药微生物,是潜在的“超级

细菌”<sup>[3,15]</sup>。1961年 Jevons 在英国首次发现对甲氧西林耐药的金葡菌(MRSA), MRSA在20世纪60年代中期扩展至欧洲及北美等地区,逐渐成为世界范围内的主要医院获得性病原体;在70年代末急剧增多并遍及全球,其引起的感染性疾病与乙型肝炎,艾滋病同为当今世界三大感染顽疾<sup>[15-16,19-20]</sup>。;而从90年代开始,MRSA更突破了以往在医院中检出的局限,进一步在社区中被大量检出,其菌株与耐药特点也随之发生变化<sup>[6-7]</sup>。

### 1.3 MRSA的耐药性

MRSA从首次发现至今50余年中,其耐药范围不断扩大,耐药程度也日益严重。上世纪80年代,庆大霉素是一般治疗MRSA感染的有效药物,而目前MRSA对其耐药率已超过50%;同期,MRSA对曾经的保留用药氟喹诺酮类药物高度敏感,但当前80%以上的MRSA对其耐药。研究发现,MRSA耐药的主要原因是其携带的*mecA*基因编码的一种对β-内酰胺类抗菌药物具低亲和力的青霉素结合蛋白PBP2a;*mecA*是一个外源基因,来自凝固酶阴性葡萄球菌或肠球菌属,通过转座子或R质粒转到原本敏感的金葡菌中,并整合在染色体第10节段上<sup>[21]</sup>,该基因组岛被称为葡萄球菌染色体盒(SCC*mec*)。PBP2a蛋白分子量为78 kD,当金葡菌固有的PBPs被β-内酰胺类抗菌药物结合失活后,PBP2a能替代其发挥转肽酶的功能,促进细胞壁合成,从而产生耐药性<sup>[22]</sup>。根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准<sup>[23]</sup>,金葡菌在检出*mecA*基因或者PBP2a蛋白时即可定义为MRSA;但菌株的耐药程度有所差异,其主要包括两大类:相对敏感型菌株和高度耐药型菌株。在培养基鉴定菌株耐药时,为克服表型的异质性,传统方法采用不易降解,MRSA异质性相对较低的苯唑西林,通过适当培养条件如在30℃或35℃培养,提高培养基NaCl浓度(2%~4%),强化耐药性表达,延长培养时间,来提高准确性<sup>[24]</sup>。

近年来,新型耐药整合子元件在MRSA中大量发现,成为MRSA耐药性发展的新特点。整合子是一种存在于细菌质粒或染色体上具有移动性的基因捕获和表达的遗传单位,在革兰氏阴性菌中被广泛报道,介导对多种抗生素的耐药性,成为革兰氏阴性菌中耐药性泛滥的主要原因<sup>[25-28]</sup>。然而在革兰氏阳性菌中一直鲜有报道。笔者根据对2001年-2006年间华南地区的MRSA耐药性研究表明<sup>[5-6,29-32]</sup>,第一类整合子在MRSA中普遍存在,但分离率低于常见报道的革兰氏阴性菌,为46.6%(122/262),远低于常见院内感染

微生物如铜绿假单胞菌(一般报道为80%以上)等;同时,前期研究显示,第一类整合子系统存在与否,对红霉素、庆大霉素、四环素和甲氧苄啶-磺胺甲唑等抗生素的耐药性具有显著影响。然而,这些抗生素均具有较长的历史,并非治疗MRSA感染的常用药物,甚至多年前已退出医院常用药物行列。例如,四环素自1948年问世至今超过60年,是应用最多、最广泛的广谱抗菌素;后来发现其对牙齿、指甲与巩膜等具有严重副作用,随后在临床使用中逐渐淘汰。庆大霉素同样由于具有较大副作用在多年前已退出治疗的一线药物。因此,近年来流行MRSA中出现的对这些抗生素耐药性可能不由临床环境中抗生素选择压力所产生。可能由于这些药物在畜牧业中仍被大量应用,因此在MRSA中出现的对这些药物的耐药性,这也暗示了畜牧业中抗生素的滥用造成了微生物在向“超级细菌”进化,这已经成为食品安全中的一个重要的潜在问题。

## 2 MRSA的检测

常规方法对MRSA的检测包括:苯唑西林纸片扩散法,乳胶凝集试验和苯唑西林琼脂筛选方法。最近,临床和实验室标准化研究所(CLSI)推荐使用的头孢西丁纸片扩散法检测MRSA<sup>[33]</sup>,以及还有一些其他的检测方法。常规培养液检测方法通常具有很高灵敏度,但是对于此方法高的灵敏度伴随的是检测速度相对比较慢。

### 2.1 纸片扩散法

纸片扩散法包括苯唑西林和头孢西丁纸片扩散法,其步骤一般包括制备菌液、接种平板、贴药敏纸片、培养等。前者把菌株在1μg苯唑西林MH琼脂培养基进行试验,抑菌圈在35℃经过24h培养确定;其抑菌圈大小是根据CLSI(2008)的标准进行判断:抑菌环直径≤10mm为耐药,11~12mm为中介,≥13mm为敏感;当抑菌圈直径在11~12mm时判断为中介,需加做*mecA*或PBP2a的检测以证实是否为MRSA。该方法最大优点是快速、简便、价格便宜,易被检验人员接受。在合适的抗生素、pH、及培养温度、菌液的浓度、培养基厚度等条件下,该方法检测MRSA是可行的。它对MRSA检出敏感性、特异性较高,仍不失为目前临床微生物实验室常规筛检MRSA方法之一。但由于多种因素的影响,从表型上进行诊断,其结果略欠准确,致使其特异性低于其他方法。许多研究均发现头孢西丁纸片法相比于苯唑西林纸片法具有更好的灵敏度<sup>[34-36]</sup>。该法把菌株在带有30μg



的苯唑西林 MH 琼脂培养基进行试验, 抑菌圈是 35 °C 经过 16~18 h 培养确定: 根据 CLSI (2008) 标准: 抑菌环直径 $\leq 21$  mm 为耐药,  $\geq 22$  mm 为敏感。该方法优点同样是快速、简便、价格便宜, 并且灵敏度高于苯唑西林纸片法。Priya Datta<sup>[32]</sup>等发现, 头孢西丁的纸片法具有 98.5% 的灵敏度和 100% 的特异性, 而苯唑西林纸片法的是 91.4% 的灵敏度和 99.2% 的特异性。但是作为 CLSI 所推荐的标准, 在检测 MRSA 时如果与一些其它方法补充可以不会有 MRSA 的漏检。苯唑西林纸片扩散法对于 MRSA 异质性耐药检测较为困难, 而头孢西丁能诱导 *mecA* 基因表达 PBP2a, 能更好地检出异质性耐药菌株。

## 2.2 苯唑西林琼脂筛选

MH 培养基加 NaCl (40 g/L) 加苯唑西林 (6  $\mu\text{g/mL}$ ), 将菌液 (0.5 麦氏浊度) 画线在培养皿上 35 °C 培养 24 h, 只要平皿有菌生长, 即使是一个菌落也判断为 MRSA, 敏感度为 100%<sup>[37]</sup>。与常规方法相比在 MRSA 检测上并无显著性, 但对于其它葡萄球菌, 琼脂筛选法有较高的阳性率, 因此尤其适用于多种葡萄球菌中 MRSA 的检测。该法操作方法简便、实验成本低, 一个平板可同时检测多个样品, 检出率高, 较为实用, 可用于 MRSA 的常规检测; 尤其当多种检测方法结果不一致时, 应以琼脂筛选为准。但是该法耗时长, 此外 Swenso 等<sup>[38]</sup>发现在异质耐药菌株进行试验时该方法敏感性下降, 特异性降低且出现边缘性 MIC; Diedere 等<sup>[39]</sup>发现 CHROM 琼脂筛选具有 97.1% 的敏感性和 99.2% 的特异性, 如果筛选周期由 24 h 变为 48 h, 菌落敏感性将会增加到 100%。

## 2.3 乳胶凝集试验

凝集试验是一种快速、操作简便的免疫学诊断方法, 在临床快速 MRSA 诊断方面应用广泛<sup>[40]</sup>。其原理是抗 PBP2a 单克隆抗体致敏的乳胶颗粒与 MRSA 的膜蛋白提取物作用, 如产生肉眼可见的凝集颗粒证实有 PBP2a 存在, 判断其为 MRSA。其它还有一些检测存在于细胞膜内 PBP2a 的乳胶试剂, 这类检测需要裂解细胞。代表的试剂盒包括 PBP2' Test (Oxoid)、MASTALEX™-MRSA (Mast) 和 MRSA Screen (Denka Seiken)。研究表明该方法的敏感性 $\geq 97\%$ <sup>[41-43]</sup>, 而 Datta 等<sup>[36]</sup>报道其具有 100% 的敏感性和 99.2% 的特异性。同时, 该方法具有与 *mecA* 基因检测相关性好、快速简便、特异性强、灵敏度高等特点, 且不需特殊仪器和技术, 尤其适合用于 MRSA 早期检测, 可作为 PCR 法的替代方法; 但检测成本较高。

## 2.4 分子生物学诊断方法

自上世纪 90 年代起, 分子生物学方法在微生物检测中逐渐取代传统方法, 主要包括 PCR、荧光定量 PCR 与各种新型核酸扩增技术等。

与常规“金标准”方法相比, PCR 技术具有较大优势。首先, 在耗时方面, 由于常规方法基于细菌培养, 因此增菌以及选择性培养耗时可长达 3 d, 但 PCR 由于检出限低, 样品中微量的菌体足以启动扩增反应, 因此在从样品处理到培养的时间可大为缩减。由于 PCR 具有高特异性, 因此以上方法的增菌与细菌培养 (LB 培养基) 阶段, 与“金标准”相比, 耗时可降低 12~24 h。其次, 细菌鉴定操作方面, “金标准”方法在细菌培养后, 常需通过血浆凝固酶实验鉴定, 而 PCR 通过选取特异的分子靶点, 结果特异性高; 该方法在鉴定金葡菌特异基因的同时, 以所有葡萄球菌的靶点为内参, 可信度更高。再次, PCR 方法的高灵敏度和特异性, 有助于解决“金标准”方法中假阴性和低敏感度的问题。笔者等以 *orfX* 为检测靶点, 建立针对 MRSA 的检测方法, 该方法已被证明是一个简单, 快速, 特异, 敏感的检测方法, 对于食品检测, 医院等机构对 MRSA 快速鉴定具有重要意义, 在未来发展中对简化检测方法的改进具有深远的意义。此外, 笔者等<sup>[44]</sup>建立的多重 PCR 体系, 针对 *16S rRNA*、*femA* 和 *mecA* 基因, 可用于 MRSA 检测。除具有常规 PCR 的优点外, 多重 PCR 能在同一次 PCR 反应和凝胶电泳分析中, 完成多个靶基因的检测, 在简便性、耗时方面具有较大优势; 本实验建立的多重 PCR 方法, 结果证实其对葡萄球菌、金葡菌及关键耐药因子进行检测与鉴定。该方法特异灵敏、简便快捷, 同时具有适应面广, 易于推广和应用等优点。

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, 实行完全闭管式操作, 不仅能大大减少扩增产物的污染机会, 提高检测的特异性, 且可通过计算机自动分析对扩增产物进行精确定量提高检测的灵敏度, 完全克服了普通 PCR 的缺点, 且该方法操作简便迅速, 适用于大样本量的筛查该方法可用于检测葡萄球菌及肠毒素。与传统的培养检测技术相比, 分子检测技术能够对食品中有害微生物实现快速、准确的检测; 与普通的 PCR 相比, 实时荧光定量 PCR 可以在 PCR 反应过程中直接检测荧光信号, 无需配胶、电泳等步骤, 可以更加快速有效地鉴别出 MRSA, 且可以对靶位基因进行定量检测。Warren 等<sup>[45]</sup>通过特定目标的一种荧光分子信标探针与扩增产物杂交, 用实时荧光 PCR 法直接从鼻咽拭子标本中快速检测 MRSA, 其敏感性为 91.7%, 特异性为 93.5%, 82.5% 能显示阳性, 97.1% 能

显示阴性,其中拭样处理和检测时间仅为1.5 h。Oh等<sup>[46]</sup>通过Xpert MRSA检测体系,在2小时内完成MRSA检测;Xpert MRSA测试法是一种快速,敏感,临床上有用的检测方法,利用SCCmec上一段特异性序列,特别适用于早期MRSA的检测。Liu等<sup>[47]</sup>通过使用一种新的集成微流体系统可以检测活MRSA、敏感金葡菌和其它病原体,该微流体系统已被证明具有100%的MRSA检测特异性;从样品预处理到荧光观察,可自动化在2.5 h内完成。Stenholm等<sup>[48]</sup>用一种即时检测的双光子激发荧光检测技术对243株MRSA进行检测,其中99.0%的MRSA真阳性样品所需时间小于14 h,该法主要优点包括简单的检测程序,试剂消耗低,以及高流量能力。

近年来有多重新型核酸技术被报道,其中环介导等温扩增(LAMP)技术是在2000年由Notomi等发明的一种体外等温扩增特异核酸片段的技术<sup>[49-50]</sup>。自问世以来,数年间已被广泛应用于生物安全、疾病诊断、食品分析及环境监测等领域。该方法在简便、快速、特异性和灵敏度方面具有显著优势。LAMP反应的灵敏度也极高,其灵敏度可达常规PCR的10~100倍(检出限是常规PCR的1/100~1/10拷贝数)。因此,对细菌进行检测时LAMP法在培养时间和所需基因拷贝数等方面具有较大优势。笔者曾对118株葡萄球菌进行16SrRNA、femA和mecA三个特异性靶点的LAMP检测<sup>[3]</sup>,其中,16SrRNA-LAMP均检测为阳性,灵敏度与阳性预测值均为100%;而PCR则只检测其中113株葡萄球菌阳性,灵敏度与阳性预测值分别为95.8%与100%。对65株金葡菌和53株凝固酶阴性葡萄球菌,femA-LAMP的灵敏度、阳性预测值与阴性预测值分别为98.5%、100%与98.1%;而PCR则相应为92.3%、100%与91.4%。对70株甲氧西林耐药菌和48株敏感菌,mecA-LAMP的灵敏度、阳性预测值与阴性预测值分别为94.3%、100%与92.3%;而PCR则分别为87.1%、100%与84.2%。同时,笔者利用MRSA中的特异靶点orfX,建立一种针对MRSA的快速检测技术。通过对116株对照菌株进行验证,显示该技术的特异性为100%,能有效针对MRSA进行特异检测。应用该技术检测667株葡萄球菌,包括566株MRSA、25株MSSA、53株MRCNS与23株MSCNS,结果显示,灵敏度达98.4%(557/566),而与之平行对比的PCR技术则仅为91.7%(519/566),阳性预测值与阴性预测值分别为100%和92.7%<sup>[51]</sup>。此外,笔者利用金葡菌中的特异femA基因,建立一种针对金葡菌的LAMP快速检测体系。通过应用于432株金葡菌(118株临床与314株食源性菌株)的检测鉴定,结果显示,检出率为98.4%,检出限为100 fg DNA/Tube与10<sup>4</sup> CFU/mL<sup>[52]</sup>。

### 3 结论

综上所述,抗生素滥用是重要的食品安全问题,其引起的后果不应局限于食物中残留的微量抗生素,而应扩展至由其引起的细菌耐药性乃至超级细菌问题。在典型的食源性微生物金葡菌中,耐药性较为普遍。其中,MRSA除引起多起食物中毒事件外,同时也是潜在的超级细菌。该类菌株的新型耐药特点显示其耐药性发展和进化可能由大量历史较久、在临床已淡出的抗生素在畜牧业中的滥用影响并决定;但其具体的分子机制有待进一步深入研究。目前,国内外科工作者已针对MRSA菌株的检测开发出了许多适用方法,其中LAMP法由于具有简便、快速、特异性强和灵敏度高等优势,已获得越来越多的关注,显示出较好的实际应用价值。

### 参考文献

- [1] 郭冬梅.我国抗感染药物市场现状分析[J].中国药房,2004,9:16-19  
GUO Dong-mei. Analysis of current situation of market of anti-infectives in China [J]. China Pharmacy, 2004, 9: 16-19
- [2] 张雁旭.抗生素滥用法律规制研究[D].新疆财经大学,2011  
ZHANG Yan-xu. Abuse of the legal regulations antibiotics [D]. Xin Jiang University of Finance, 2011
- [3] 李振,王云建.畜禽养殖中抗生素使用的现状、问题及对策[J].中国动物保健,2009,7:55-57  
LI Zhen, WANG Yun-jian. The problems and solutions of the use of antibiotics in livestock farming [J]. China Animal Health, 2009, 7: 55-57
- [4] 叶蕾.广州市水产养殖品中耐药共生菌分布及耐药基因传播机制的研究[D].华南理工大学,2012  
YE Lei. Prevalence of antibiotic resistant commensal bacteria associated with aquaculture products and the dissemination of antibiotic resistant gene from Guangzhou, China [D]. South China University of Technology, 2012
- [5] Wollenberger L, Halling-srensen B, Kusk K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna [J]. Chemosphere, 2000, 40(7): 723-730
- [6] 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
- [7] Xu Z, Li L, Chu J, et al. Development and application of

- loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains [J]. Food Research International, 2012, 47(2): 166-173
- [8] Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2010, 10(9): 597-602
- [9] Walsh T R, Weeks J, Livermore D M, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2011, 11(5): 355-362
- [10] Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, et al. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(11): 4914-4916
- [11] Castanheira M, Deshpande L M, Mathai D, et al. Early dissemination of NDM-1 and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(3): 1274-1278
- [12] Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(2): 934-936
- [13] Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. International transfer of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(4): 1821-1822
- [14] Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(6): 1255-1259
- [15] Hardy K J, Hawkey P M, Gao F, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill [J]. British Journal of Anaesthesia, 2004, 92(1): 121-130
- [16] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC estimates of foodborne illness in the United States: CDC 2011 estimates [R]. GA, 2011
- [17] 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
- [18] 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]. Clinical Microbiology and Infection, 2007, 13(10): 980-984
- [19] Nada T, Ichiyama S, Osada Y, et al. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates [J]. Journal of Hospital Infection, 1996, 32(4): 305-317
- [20] 杨长顺. MRSA 耐药机制与分子生物学检测方法研究新进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(3): 356-358
- YANG Chang-shun. New progress MRSA resistance mechanisms and molecular biology detection methods [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2007, 17(3): 356-358
- [21] Lee J H. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(1): 155-159
- [22] Labischinski H. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. Medical Microbiology and Immunology, 1992: 1815
- [23] Stenholm T, Hakanen A J, Salmenlinna S, et al. Evaluation of the TPX MRSA assay for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. European journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011, 30(10): 1237-1243
- [24] Hartman B J, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1986, 29(1): 85-92
- [25] Hall R M, Collis C M, Kim M I J, et al. Mobile gene cassettes and integrons in evolution [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999, 870(1): 68-80
- [26] Hall R M, Stokes H W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination [J]. Genetica, 1993, 90(2-3): 115-132
- [27] 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
- [28] Recchia G D, Hall R M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons [J]. Trends in Microbiology, 1997, 5(10): 389-394
- [29] Xu Z, Shi L, Alam M J, et al. Integron-bearing



- methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(2): 223-230
- [30] Xu Z, Li L, Alam M J, et al. First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Current Microbiology*, 2008, 57(3): 264-268
- [31] 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
- [32] 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]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010, 68(3): 315-317
- [33] Steinkraus G, White R, Friedrich L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05 [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(4): 788-794
- [34] Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55(3): 379-382
- [35] Boutiba Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10(8): 762-765
- [36] Felten A, Grandry B, Lagrange P H, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(8): 2766-2771
- [37] Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, et al. Improved methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2001, 20(4): 267-270
- [38] Swenson J M, Williams P P, Killgore G, et al. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(10): 3785-3788
- [39] Diederer B, van Duijn I, van Belkum A, et al. Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(4): 1925-1927
- [40] Thomas R, Kuriakose T, George R. Towards achieving small-incision cataract surgery 99.8% of the time [J]. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2000, 48(2): 145
- [41] Van Leeuwen W B, van Pelt C, Luijendijk A D, et al. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(9): 3029-3030
- [42] Verma S, Joshi S, Chitnis V, et al. Growing problem of methicillin resistant staphylococci-Indian scenario [J]. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2000, 54(12): 535
- [43] Udo E E, Mokadas E M, Al-Haddad A, et al. Rapid detection of methicillin resistance in staphylococci using a slide latex agglutination kit [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 15(1): 19-24
- [44] Xu Z, Li L, Zhao X, et al. Development and application of a novel multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of various types of staphylococci strains [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5: 1869-1873
- [45] Warren DK, Liao RS, Merz LR, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(12): 5578-5581
- [46] Oh A C, Lee J K, Lee H N, et al. Clinical utility of the Xpert MRSA assay for early detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2013, 7(1): 11-15
- [47] Liu Y H, Wang C H, Wu J J, et al. Rapid detection of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using an integrated microfluidic system capable of ethidium monoazide pre-treatment and molecular diagnosis [J]. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(3): 034119
- [48] Stenholm T, Hakanen A J, Salmenlinna S, et al. Evaluation of the TPX MRSA assay for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*,

- 2011, 30(10): 1237-1243
- [49] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e63
- [50] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(9): 1742-1743
- [51] Su J, Liu X, Cui H, et al. Rapid and simple detection of methicillin-resistance *staphylococcus aureus* by orfX loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1): 8
- [52] Zhao X H, Park M S, Zhang Y H. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *femA* gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(2): 246-250

现代食品科技