

石河子地区乳源性金黄色葡萄球菌毒力及耐药性的研究

田会丽, 袁筠, 廖超, 孟云, 糜唯钰, 姬华, 王周平
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 本文研究了石河子地区乳源性金黄色葡萄球菌的污染情况、毒力特性及耐药性。对 24 份零售鲜奶样品进行金黄色葡萄球菌定量检测, PCR 方法检测 *nuc*、16S rRNA 和 7 种毒力基因, 利用 Kirby-Bauer 法对分离得到的金黄色葡萄球菌进行了 12 种抗生素的药物敏感试验。共分离 55 株疑似乳源性金黄色葡萄球菌, *nuc* 和 16S rRNA 基因 PCR 扩增检测结果中有 20 株菌为阳性。毒力基因检测结果中有 5 株 (5/20; 25%) 携带毒力基因, 其中 3 株携带 *Coa* (3/5; 60%), 1 株携带 *Sei* (1/5; 20%), 1 株携带 *Sea+Sec+Coa* (1/5; 20%)。发现 20 株金黄色葡萄球菌中有 19 株对所测试的一种或多种抗生素具有抗性, 且 19 株均对亚胺培南和氯霉素敏感。本文为指导抗生素在人类临床和动物饲养中的合理应用提供重要的参考性数据, 为乳品中有害金黄色葡萄球菌的风险评估提供理论依据。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 药敏试验; 毒力基因; PCR

文章编号: 1673-9078(2017)9-265-270

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.039

Virulence Characteristics and Drug Resistance of Milk-derived *Staphylococcus aureus* Isolates from the Shihezi Region

TIAN Hui-li, YUAN Jun, LIAO Chao, MENG Yun, MI Wei-yu, JI Hua, WANG Zhou-ping
(College of Food, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: The aim of this work was to investigate the contamination, virulence characteristics, and drug resistance of milk-derived *Staphylococcus aureus* in the Shihezi region. The quantitative detection of *S. aureus* was carried out on 24 retail milk samples, and the presence of *nuc*, 16S rRNA, and virulence genes was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). The Kirby-Bauer method was used to test the sensitivity of *S. aureus* to 12 antibiotics. A total of 55 suspected isolates of milk-derived *S. aureus* were obtained, and 20 isolates were positive in *nuc* and 16S rRNA gene PCR amplification assays. The virulence gene detection revealed five (5/20; 25%) *S. aureus* isolates carrying virulence genes, [three isolates carrying *Coa* (3/5; 60%), one isolate carrying *Sei* (1/5; 20%), and one isolate carrying *Sea + Sec + Coa* (1/5; 20%)]. Nineteen out of 20 isolates of *S. aureus* were found to be resistant to one or more of the tested antibiotics by the disk diffusion method. All the 19 isolates were sensitive to imipenem and chloramphenicol. This paper provides important reference data for rational application of antibiotics in clinical practice and animal breeding and provides the theoretical basis for the risk assessment of harmful *S. aureus* strains in dairy products.

Key words: *Staphylococcus aureus*; antibiotic resistance test; virulence gene; polymerase chain reaction

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 作为一种常见的食源性致病菌, 在自然界中广泛存在。摄入被金黄色葡萄球菌污染的食物造成的葡萄球菌食物中毒是最常见的第二大食源性疾病^[1]。在不清洁的环境

收稿日期: 2017-04-11

基金项目: 石河子大学重大科技攻关计划项目 (gx.js2015-zdgg65); 国家大学生创新创业训练计划项目 (201610759045)

作者简介: 田会丽 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测
通讯作者: 姬华 (1980-), 女, 工学博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全; 王周平 (1974-), 男, 理学博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全分析研究

中金黄色葡萄球菌频繁地污染食物, 如肉、禽、蛋、奶及奶制品, 从而引起多种感染, 包括皮炎, 胃肠炎和中毒性休克综合征^[2]。金黄色葡萄球菌肠毒素耐高温, 即使细菌已死亡, 仍有可能引起中毒, 此时即使样本培养为阴性也不能排除金黄色葡萄球菌性食物中毒的可能性^[3]。对携带毒力基因金黄色葡萄球菌的检测是当今研究的重点, 其主要肠毒素是 SEA~SEE 等 5 种血清型, 以 SEA 引起食物中毒为多见; 随着研究的深入, 许多新型肠毒素血清型如 SEG、SHE、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、SEP、SEQ 和 SER 被发现^[4], 但由其引起的食物中毒少有报道。近

年来,随着抗生素药物在畜牧业生产和临床治疗中的广泛使用,金黄色葡萄球菌的耐药性不断增强成为广泛关注的公共卫生问题^[5]。长期食用有抗生素残留的牛乳或乳制品,相当于长期低剂量的摄入抗生素,从而使人体肠道内的正常菌群受到抑制,导致致病菌大量繁殖引起全身或局部感染^[6]。其耐药性的出现不仅给临床及兽医用药带来麻烦,重要的是其耐药性还可通过食物链传播,临床细菌的耐药性与食物中细菌的耐药性直接相关^[7]。为此对分离出的金黄色葡萄球菌进行了耐药性测定,研究其耐药种类,为临床用药及制定合理用药措施提供一定的参考。

本文通过对石河子地区零售鲜奶中金黄色葡萄球菌的分离纯化、鉴定、耐药性及毒力特性分析,揭示石河子地区乳源性金黄色葡萄球菌对兽医和临床常用药品的耐药情况。为指导抗生素在人类临床和动物饲养中的合理应用,控制有害金黄色葡萄球菌在自然界传播提供重要的参考性数据。本文数据为乳品中有害金黄色葡萄球菌的风险评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及培养基

用于 PCR 扩增的全套试剂及合成引物购自生物工程(上海)股份有限公司; Baird-Parker 培养基、1%卵黄亚硝酸钾溶液、细菌微量生化鉴定管(兔血浆)和脑心浸液肉汤(BHI)均购自青岛海博生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、乙二胺四乙酸(EDTA)和琼脂均购自 Solarbio 公司。

12种抗菌药物纸片,即头孢他啶(30 μg/片),亚胺培南(10 μg/片),环丙沙星(5 μg/片),左氟沙星(5 μg/片),氯霉素(30 μg/片),阿米卡星(30 μg/片),哌拉西林(100 μg/片),红霉素(15 μg/片),阿莫西林(10 μg/片),多粘菌素 B(300 μg/片),链霉素(10 μg/片),萘啶酮酸(30 μg/片),购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 金黄色葡萄球菌污染水平调查

根据《中华人民共和国国家标准:GB 4789.10-2010 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验》^[8]中第三法金黄色葡萄球菌 MPN 计数法对石河子零售鲜牛奶样品中金黄色葡萄球菌进行培养纯化和生化试验。具体步骤如下:根据对鲜牛奶样品污染状况的估

计,选择3个适宜稀释度的样品匀液,在进行10倍递增稀释时,每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液接种到10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤管,每个稀释度接种3管,将上述接种物于36±1 °C培养48 h。用接种环从有细菌生长的各管中,移取1环,分别接种 Baird-Parker 平板,36±1 °C培养48 h。从典型菌落中至少挑取1个菌落接种到BHI肉汤,36±1 °C培养24 h。进行血浆凝固酶试验。计算血浆凝固酶试验阳性菌落对应的管数,查MPN检索表,报告每mL样品中金黄色葡萄球菌的最可能数,以MPN/mL表示。

1.3 *nuc* 基因 PCR 检测

根据文献报道^[9]对金黄色葡萄球菌特异性基因-耐热核酸酶基因 *nuc* 进行 PCR 检测,合成引物 P1: 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' 和 P2 : 5'-AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC-3', 目标片段为 267 bp。采用改良尿素法^[10]提取模板 DNA, 进行 PCR 检测。*nuc* 基因扩增的反应体系(25 μL)为 2×Taq PCR masterMix 7.2 μL; 引物(正反引物总计)4 μL; DNA 模板 1 μL; ddH₂O 12.8 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 初始变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 37 个循环; 72 °C 最后延伸 3.5 min。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增

应用细菌 16S rRNA 基因通用引物^[11,12](27f: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTC AG-3', 1492r: 5'-TACGGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化后,选取部分菌株 DNA 由上海生工生物科技有限公司采用正向扩增引物直接测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库中,序列同源性分析利用 BLAST 在线进行。

1.5 毒力基因 PCR 扩增

按照文献报道对金黄色葡萄球菌的 *Sea*、*Seb*、*Sec*、*Sei*、*Coa* (凝固酶)、*Tst* 和 *Seg* 等 7 种毒力基因进行 PCR 鉴定。根据文献和 GenBank 上公布的序列进行基因比对,设计 7 种毒力基因相关引物^[13](表 1)。毒力基因 PCR 扩增的反应体系(20 μL)为 2×Taq PCR masterMix 10 μL, 引物(正反引物总计)2 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 初始变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 在 72 °C 最后延伸 8 min。

表1 毒力基因 PCR 扩增引物合成序列

Table 1 Primer sequences for the PCR amplification of

virulence genes

基因	引物序列 (5'-3')	目标片段 /bp
Sea	F-CTGTTTCAGGAGTTGGATCTTC	156
	R-CTTGAGCACCAAATAAATCG	
coa	F-CGTTACAAGGTGAAATCGTT	247
	R-CCATATTGAGAAGCTTCTGTG	
Sec	F-CCACTTTGATAATGGGAACCTTAC	270
	R-GATTGGTCAAACCTTATCGCCTGG	
Seb	F-CCAGATCCTAAACCAGATGAGTT	326
	R-GTTTTTCGTTTATCAGTTTGATG	
Sei	F-GGTGATATTGGTGTAGGTAA	451
	R-CATATTCTTTGCCTTTACCAG	
Seg	F-GGTTCAATTGTCAAATAGACTG	520
	R-CTATTGTCGATTGTTACCTG	
Tst	F-CCCTTTGTTGCTTGCGAC	569
	R-TGGATCCGTCATTCATTGTTA	

表2 阳性样品中金黄色葡萄球菌最可能数

Table 2 The most probable number of *Staphylococcus aureus*

cells in the test-positive samples

样品编号	牛奶样品来源	阳性管数			MPN
		0.1	0.01	0.001	
16	24 小区	3	3	3	> 1100
12	11 小区	3	3	2	1100
23	5 小区	3	2	2	210
24	5 小区	3	1	2	120
9	31 小区	3	2	0	93
13	22 小区	3	1	0	43
18	12 小区	3	0	0	23
19	5 小区	2	2	0	21
21	11 小区	2	2	0	21
17	东明新区小区	1	3	0	16
22	11 小区	2	3	0	16
8	31 小区	2	1	0	15
10	24 小区	1	1	1	11
20	11 小区	1	2	0	11
14	老街	0	1	0	3
11	老街	0	0	0	<3
15	22 小区	0	0	0	<3

1.6 耐药性测定

分离到的金黄色葡萄球菌通过 K-B 法检测其耐药性^[5,14,15]。根据 0.5 麦氏比浊对比, 将活化好的金黄色葡萄球菌涂布于平板上。将药敏纸片贴在涂布好的平板上, 静置 5 min, 然后将平板置于 37℃ 培养 24 h。测量并记录抗生素对所试金黄色葡萄球菌的抑菌直径。试验结果按国际现行的临床实验室标准化协会(简称 CLSI)^[16]制定的《抗微生物药物敏感性试验执行标准》纸片法标准进行判定。

2 结果与分析

2.1 鲜奶中金黄色葡萄球菌的定量检测

对石河子市区零售鲜奶中金黄色葡萄球菌污染状况的调查, 24 份样品中 7 份样品未检出金黄色葡萄球菌, 共分离 55 株疑似乳源性金黄色葡萄球菌, 阳性率为 70.83%, 说明该菌在零售生鲜乳中广泛存在。在 Baird-Parker 平板上, 菌落直径为 1 mm~3 mm, 颜色呈黑色, 周围为一混浊带, 在其外层有一磷脂环。对样品中金黄色葡萄球菌进行 MPN 定量检测, 17 份阳性样品中 15 份样品金黄色葡萄球菌的 MPN/mL \geq 3, 2 份样品 MPN/mL $<$ 3, 结果如表 2。样品 12 和 16 中金黄色葡萄球菌的 MPN 值最大, MPN /mL \geq 1100, 样品 11 和 15 的 MPN 值最小, 其 MPN/mL $<$ 3。

2.2 PCR 基因检测结果

2.2.1 nuc 和 16S rRNA 基因 PCR 检测结果

55 株疑似乳源性金黄色葡萄球菌经 *nuc* 和 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增鉴定后, 有 20 株菌在 *nuc* 基因检测中产生了 267 bp 左右的目标片段(图 1)和 16S rRNA 基因检测中产生了 1450 bp 左右的目标片段(图 2), 确定为金黄色葡萄球菌菌株。

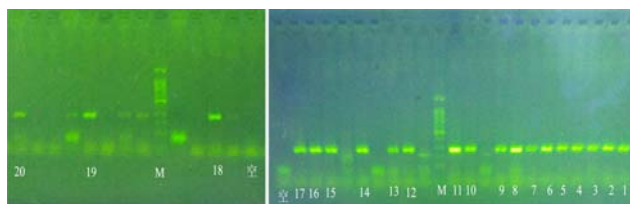


图 1 *nuc* 基因扩增产物电泳图

Fig.1 Electropherograms of amplification products of the *nuc* gene

注: 菌株编号, Lane 1: 18-3; lane 2: 17-3; lane 3: 16-4; lane 4: 14-6; lane 5: 20-2; lane 6: 19-1; lane 7: 17-4; lane 8: 21-5; lane 9: 23-2; lane 10: 9-3; lane 11: 21-4; lane 12: 8-2; lane 13: 10-3; lane 14: 11-2; lane 15: 22-1; lane 16: 15-3; lane 17: 14-1; lane 18: 12-1; lane 19: 24-1; lane 20: 13-2; lane M: 100 bp ladder marker; lane 空: negative control.

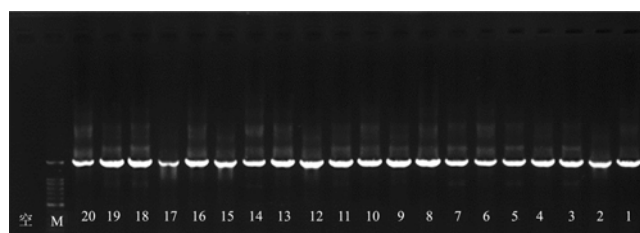


图2 16S rRNA 基因扩增产物电泳图

Fig.2 An electropherogram of amplification products of the 16S rRNA gene

注: 菌株编号, Lane 1: 18-3; lane 2: 17-3; lane 3: 16-4; lane 4: 14-6; lane 5: 20-2; lane 6: 19-1; lane 7: 17-4; lane 8: 21-5; lane 9: 23-2; lane 10: 9-3; lane 11: 21-4; lane 12: 8-2; lane 13: 10-3; lane 14: 11-2; lane 15: 22-1; lane 16: 15-3; lane 17: 14-1; lane 18: 12-1; lane 19: 24-1; lane 20: 13-2; lane M: 100bp ladder marker; lane 空: negative control.

2.2.2 毒力基因 PCR 检测结果

20 阳性株中有 5 株分离菌 (5/20; 25%) 是携带毒力基因的, 其中 3 株携带 *Coa* (3/5; 60%) 分别为菌株 14-1、14-6 和 21-5, 1 株携带 *Sei* (1/5; 20%) 为菌株 15-3, 1 株携带 *Sea+Sec+Coa* (1/5; 20%) 为菌株 21-4。分离所得菌株中没有检测到 *Seb*、*Seg* 和 *Tst* 基因。

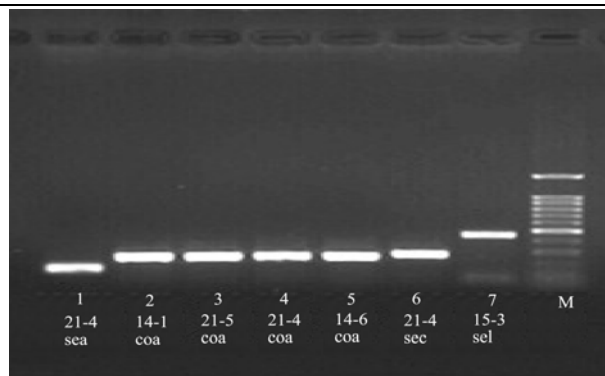


图3 毒力基因扩增产物电泳图

Fig.3 An electropherogram of amplification products of virulence genes

注: lane M 表示 100 bp ladder marker.

2.3 金黄色葡萄球菌耐药性

2.3.1 受试菌株抗生素的耐药率

20 株金黄色葡萄球菌对头孢他啶的抗性 (95.00%) 最高, 其次是哌拉西林和阿莫西林的耐药率 (70.00%), 萘啶酮酸 (45.00%), 红霉素 (30.00%), 环丙沙星、左氟沙星和阿米卡星的耐药率 (10.00%), 链霉素和多粘菌素 B 的耐药率 (5.00%), 所有测试抗生素敏感性的菌株对亚胺培南和氯霉素敏感, 如表 3。

表3 乳源性金黄色葡萄球菌耐药率

Table 3 Drug resistance rates of *S. aureus* isolates from milk

菌株	抗生素											
	头孢他啶	亚胺培南	环丙沙星	左氟沙星	氯霉素	阿米卡星	哌拉西林	红霉素	阿莫西林	链霉素	萘啶酮酸	多粘菌素 B
19-1	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
9-3	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	I
12-1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23-2	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S
21-5	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
21-4	R	S	S	S	S	S	R	S	R	I	I	I
15-3	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	I
14-1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
16-4	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
24-1	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	I
10-3	R	S	S	S	S	R	R	I	R	S	I	S
8-2	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S
17-3	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I
11-2	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
13-2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
22-1	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
14-6	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I	I

转下页

接上页

17-4	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S
18-3	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20-2	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
耐药菌株数	19	0	2	2	0	2	14	6	14	1	9	1
耐药率	95.0%	0.0%	10.0%	10.0%	0.0%	10.0%	70.0%	30.0%	70.0%	5.0%	45.0%	5.0%

注：“R”表示耐药；“I”表示中介；“S”表示敏感。

2.3.2 金黄色葡萄球菌的多重耐药性

表4 金黄色葡萄球菌的多重耐药菌株

Table 4 Multidrug-resistant strains among the tested *S. aureus*

isolate	耐药药物数量	菌株	多重耐药菌株所占比例(n=20)
	7	2	10.00%
	5	4	20.00%
	4	4	20.00%
	3	5	25.00%
	2	1	5.00%
	1	3	15.00%
	0	1	5.00%

在本研究中,发现 20 株金黄色葡萄球菌中有 19 株对所测试的一种或多种抗生素具有抗性,仅菌株 18-3 对所测试的抗生素敏感。所有菌株中的 3 株 (15.00%) 显示单一抗性,均对头孢他啶耐药;1 株 (5.00%) 存在双重抗性;其他 15 株 (75.00%) 显示出多种 (抗生素) 抗性。20 株菌中 2 株为 7 重耐药,4 株为 5 重耐药。

3 讨论与结论

3.1 零售鲜奶的污染情况

对石河子市区零售鲜奶中金黄色葡萄球菌污染状况的调查,鲜牛奶阳性率为 70.83%,此结果高于徐勤^[17],薛秀恒^[3]等生牛奶中金黄色葡萄球菌的检出率,但与 Gücükoglu A 等^[2]人报道的鲜牛乳中金黄色葡萄球菌 75% 的检出率基本一致,说明金黄色葡萄球菌在零售生鲜乳中广泛存在。对样品进行 MPN 定量检测,样品中金黄色葡萄球菌的浓度范围在 3~1100 MPN/mL,17 份阳性样品中 15 份样品金黄色葡萄球菌的 MPN/mL \geq 3,2 份样品 MPN/mL $<$ 3。其中样品 12 和 16 中金黄色葡萄球菌的 MPN 最高,MPN/mL \geq 1100,不同样品中金黄色葡萄球菌的检出浓度差别较大。生鲜乳极易受外界环境的影响,对于金黄色葡萄球菌的控制主要集中在牛舍卫生、挤奶用具、运输销售以及奶牛乳房炎的防治。经常对牛舍进行卫生清理,使其清洁无异味;对挤奶设备进行严格的清

洗消毒,尤其是个体奶农的个人卫生;运输过程中对牛奶的品质影响很大,特别在夏季,所以低温运输可以有效控制微生物的生长繁殖;对于感染乳房炎的奶牛予以隔离治疗,降低金黄色葡萄球菌的污染程度,防止病原菌的繁殖及产毒。

3.2 金黄色葡萄球菌的毒力特性

毒力基因 PCR 检测结果中有 5 株分离菌 (5/20; 25%) 是携带毒力基因的,其中 3 株携带 *Coa* (3/5; 60%) 分别为菌株 14-1、14-6 和 21-5,1 株携带 *Sei* (1/5; 20%) 为菌株 15-3,1 株携带 *Sea+Sec+Coa* (1/5; 20%) 为菌株 21-4。5 株菌均对头孢他啶、哌拉西林和阿莫西林有耐药性,所以在对奶牛用药时应尽量避免这三种抗生素药物。分离所得菌株中没有检测到 *Seb*、*Seg* 和 *Tst* 基因。血浆凝固酶试验结果与毒力基因 *Coa* 的检测结果不一致,血浆凝固酶试验存在假阳性现象。金黄色葡萄球菌肠毒素耐高温,即使细菌已死亡,仍有可能引起中毒,此时即使样本培养为阴性也不能排除金黄色葡萄球菌性食物中毒的可能性。5 株携带毒力基因的菌种来自 14 号、15 号和 21 号等 3 个样品,占总样品量的 12.5%,所以有效的防控金黄色葡萄球菌产毒菌株对消费者健康非常重要。

3.3 金黄色葡萄球菌的耐药性

药敏试验表明,20 株金黄色葡萄球菌对头孢他啶的抗性 (95.00%) 最高,其次是哌拉西林和阿莫西林的耐药率 (70.00%),萘啶酮酸 (45.00%),红霉素 (30.00%),环丙沙星、左氟沙星和阿米卡星的耐药率 (10.00%),链霉素和多粘菌素 B 的耐药率 (5.00%),对亚胺培南和氯霉素敏感。环丙沙星、氧氟沙星和左氟沙星在 CLSI 分组中为同一组的药物,他们的结果解释和临床效果是相似的,药物环丙沙星和左氟沙星的试验结果与文献一致^[15]。此外,发现 20 株金黄色葡萄球菌中有 19 株对所测试的一种或多种抗生素具有抗性,仅 1 株对所测试的抗生素敏感。所有菌株中的 3 株 (15.00%) 显示单一抗性,均对头孢他啶耐药;1 株 (5.00%) 存在双重抗性;其他 15 株 (75.00%) 显示出多种 (抗生素) 抗性。现在奶牛在饲养过程中

存在一定的安全问题, 抗生素的滥用已经影响到了牛奶的品质, 应加强监测, 合理应用抗菌药物。

新疆地区对生鲜乳需求量较大, 且个体奶农零售鲜奶现象普遍存在, 试验结果表明在 70.83% 的样品中存在金黄色葡萄球菌, 鲜奶的质量控制迫在眉睫。此外, 在生牛乳中存在致肠毒素和多重耐药性菌株可能构成消费者健康的潜在风险。个体奶农的个人卫生标准及微生物控制体系尚不完善, 所以更好地控制生鲜乳污染源, 采取卫生措施对于食品安全是必不可少的。

参考文献

- [1] Huang Yu-kun, Chen Xiu-juan, Duan Nuo, et al. Selection and characterization of DNA aptamers against *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 623-629
- [2] Gücükoglu A, Onur Kevenk T, Uyanik T, et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk and dairy products by multiplex PCR [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(11): 620-623
- [3] 薛秀恒, 孙茂忠, 王菊花, 等. 安徽不同地区奶站牛奶中金黄色葡萄球菌及其肠毒素污染状况评估[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4): 302-306
XUE Xiu-heng, SUN Mao-zhong, WANG Ju-hua, et al. Evaluation of *Staphylococcus aureus* and Its enterotoxin contamination in dairy milk of different areas in anhui province [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(4): 302-306
- [4] Gücükoglu A, Cadirci O, Terzi G, et al. Determination of enterotoxigenic and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in ice cream [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(5): 738-741
- [5] 李建平. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分型及其主要毒力因子和耐药性的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2009
LI Jian-ping. Pulsed field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus* and its main virulence factors and drug resistance in Dairy cow mastitis [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2009
- [6] 郭业民. 基于适配体传感器的牛奶中抗生素残留快速检测技术研究[D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2015
GUO Ye-min. Study on rapid determination technology for antibiotic residue in milk based on aptasensor [D]. Heilongjiang: Northeast Agricultural University, 2015
- [7] Yesim Can H, Haluk Celik T. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses [J]. Food Control, 2012, 24(1-2): 100-103
- [8] GB 4789.10-2010, 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S]
GB 4789.10-2010, Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Staphylococcus aureus* test [S]
- [9] Brakstad O G, Aasbakk K, Maeland J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(7): 54-61
- [10] 曹文波, 郑璐璐, 谢文海. 一种提取植物基因组 DNA 的方法-改良尿素法[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2008, 42(3): 448-451
CAO Wen-bo, ZHENG Lu-lu, XIE Wen-hai. The modification urea method: an improved method for plant DNA isolation [J]. Journal of Huazhong Normal University (Nat. Sci.), 2008, 42(3): 448-451
- [11] Kusumaningrum H D, Handayani L, Novrianti R. Partial sequencing of 16S rRNA gene of selected *Staphylococcus aureus* isolates and its antibiotic resistance [J]. Media Peternakan, 2016, 2: 67-74
- [12] 于洋, 倪永清. 干酪中肠球菌种群的遗传差异及万古霉素抗性基因分析[J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 149-153
YU Yang, NI Yong-qing. Genetic divergence and vancomycin-resistance genes analysis of enterococci isolated from cheese samples [J]. China Brewing, 2016, 35(5): 149-153
- [13] S Nagaraj, S Ramlal, M H Sripathy, et al. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. J Appl. Microbiol., 2014, 116(2): 435-446
- [14] 黄丹. 乳源性金黄色葡萄球菌耐药及产肠毒素特性研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2008
HUANG Dan. Study on drug resistance and enterotoxigenicity of milk-derived [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2008
- [15] Vincenzo Spanu, Christian Scarano, Francesca Cossu, et al. Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese [J]. Food Sci., 2014, 79(10): 2066-2071
- [16] Fallis A G. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards institute, CLSI [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2013, 53(9): 1689-1699

- [17] 徐勤,巢国祥.生牛奶中金黄色葡萄球菌污染状况及耐药性
状研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(8):972-973
XU Qin, CHAO Guo-xiang. Contamination and drug
resistance of *Staphylococcus aureus* in raw milk [J]. Chinese
Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(8):
972-973

现代食品科技