

牛肉中金黄色葡萄球菌的复核鉴定研究

皮志媛¹, 何晓杰¹, 叶尔保勒², 阿斯喀², 王振宝^{2*}

(1. 伊犁职业技术学院, 新疆伊宁 835000; 2. 伊犁出入境检验检疫局, 新疆伊宁 835000)

摘要 [目的]采用2种方法复核检出牛肉中金黄色葡萄球菌阳性结果, 确保检测结果的准确性。[方法]按照 GB 4789.10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》方法前增菌、选择性分离培养、革兰氏染色和血浆凝固酶试验鉴定金黄色葡萄球菌, 应用 SN/T 1870—2007《食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法》对疑似阳性结果进行了进一步验证和复核。[结果]经过2种方法验证可疑菌落, 该批牛肉中检出金黄色葡萄球菌。[结论]分离并鉴定牛肉中金黄色葡萄球菌可疑样品时, 可采用不同方法进行验证和复核, 该方法可提高检测结果的准确性, 可用于畜禽肉中致病菌的检测。

关键词 金黄色葡萄球菌; 复核鉴定; 牛肉

中图分类号 S851.34+7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)19-176-02

Study on Identification of *Staphylococcus aureus* from Beef

PI Zhi-yuan¹, HE Xiao-jie¹, YE'ER Bao-le², WANG Zhen-bao^{2*} et al (1. Yili Vocational and Technical College, Yining, Xinjiang 835000; 2. Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yining, Xinjiang 835000)

Abstract [Objective] Two methods were used to review positive results of *Staphylococcus aureus* from beef to ensure the accuracy of test results. [Method] According to the *Food Microbiological Examination: Staphylococcus aureus Test* (GB 4789.10—2010), *S. aureus* from beef was identified through propagation of bacteria, selective separation culture, Gram staining, and plasma coagulase test, and the suspected positive results of *Staphylococcus aureus* from beef were verified and reviewed according to the *Detection of Pathogens in Food—Real-time PCR Method* (SN/T 1870—2007). [Result] The identification of questionable colony by the two methods indicated that there was *S. aureus* in beef. [Conclusion] The two methods can be used to verify and review the identification results of suspected samples of *S. aureus* from beef, and they are more accurate and can be used to detect pathogens in livestock and poultry meat.

Key words *Staphylococcus aureus*; Identification; Beef

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 是人和动物的常见病原菌, 隶属葡萄球菌属(*Staphylococcus*), 革兰氏阳性菌, 可引起多种严重感染, 有“嗜肉菌”的别称, 其所导致的食物中毒主要是由肠毒素引起的。金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在, 在空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到^[1-2]。由金黄色葡萄球菌引起食物中毒的食品主要有肉、蛋、乳及其制品等^[3-4]。我国生鲜肉流通和运输环节包装简单或不包装, 增加了其在运输、储存和消费过程中受到二次污染的机率, 金黄色葡萄球菌成为我国肉品检测过程中重要的检测项目之一^[5]。目前, 对牛肉中金黄色葡萄球菌的检验大多采用 GB 4789.10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》方法, 按照前增菌、选择性分离培养、革兰氏染色和血浆凝固酶试验等流程鉴定金黄色葡萄球菌^[6], 该方法由于受检测人员的专业水平和经验等多种因素的限制, 容易出现误判^[7], 且血浆凝固酶试验易受到金黄色葡萄球菌的培养时间、反应时间和体积等因素的影响, 从而经常出现延迟凝固的现象, 易造成漏检^[8]。针对上述问题, 为了提高检测结果的准确性, 笔者对国标方法检出的牛肉中金黄色葡萄球菌可疑样品应用 SN/T 1870—2007《食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法》^[9]进行了进一步验证和复核, 以期为畜禽肉中致病菌的检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品 选取送检的鲜牛肉样品进行试验。

基金项目 伊犁州直科学研究与技术开发计划项目(YZ201302017)。
作者简介 皮志媛(1987—), 女, 天津人, 助教, 硕士, 从事动物检验检疫工作。* 通讯作者, 兽医师, 硕士, 从事动物检验检疫工作。

收稿日期 2016-05-16

1.2 标准菌株与试剂 金黄色葡萄球菌阳性菌株, 由伊犁出入境检验检疫局实验室保存。7.5%氯化钠肉汤、血琼脂平板、Baird-Parker 琼脂平板、脑心浸出液肉汤(BHI)、兔血浆、革兰氏染色液, 均购自北京陆桥技术股份有限公司; 金黄色葡萄球菌鉴定引物和探针、chelex 100 粉末、PCR 试剂等, 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 仪器 恒温培养箱(宾得 400 型)、实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500 型)、天平(梅特勒 MS1602S 型)、均质器(AES EasyMix 型)、离心机(贝克曼 Allegra X-22R 型)。

1.4 样品的处理 无菌操作取样, 制成匀质检样, 称取 25 g 匀质检样至盛有 225 mL 7.5%氯化钠肉汤的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1~2 min, 制成 1:10 的样品匀液, 用于金黄色葡萄球菌的检测。

1.5 增菌 将上述样品匀液于(36±1)℃下培养 18~24 h。

1.6 分离培养 将上述培养物分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板, 血平板(36±1)℃下培养 18~24 h, Baird-Parker 平板(36±1)℃下培养 45~48 h, 培养结束后观察菌落生长特征。

挑取 Baird-Parker 平板或血平板上可疑菌落 1 个及以上, 接种到 5 mL BHI, (36±1)℃下培养 18~24 h。同时, 进行革兰氏染色并镜检。

1.7 血浆凝固酶试验 取新鲜配制兔血浆 0.5 mL, 放入小试管中, 再加入 BHI 培养物 0.2~0.3 mL, 振荡摇匀, 置于(36±1)℃温箱内, 每 30 min 观察 1 次, 观察 6 h。同时, 以金黄色葡萄球菌标准阳性菌株肉汤、阴性葡萄球菌菌株的肉汤和 BHI 肉汤空白培养基为对照。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测

1.8.1 模板 DNA 的制备。

1.8.1.1 增菌液模板 DNA 的制备。分别取“1.5”和“1.6”中培养的 7.5% 氯化钠肉汤增菌液和 BHI 培养物各 1 mL, 分别加入 1.5 mL 无菌离心管中, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 每管加入 50 μ L DNA 提取液(使用前室温解冻并充分混匀, 快速吸取), 混匀后沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清保存于 -20 $^{\circ}$ C 下备用。

1.8.1.2 可疑菌落模板 DNA 的制备。挑取“1.6”中 Baird - Parker 平板和血平板上的可疑菌落, 分别加入 50 μ L DNA 提取液, 混匀后沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清保存于 -20 $^{\circ}$ C, 备用。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测

1.9.1 实时荧光定量 PCR 反应体系。实时荧光定量 PCR 反应体系 (25 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L、引物对 (10 μ mol/L) 各 1 μ L、探针 (10 μ mol/L) 1 μ L、dNTP (10 mmol/L) 1 μ L、Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L、水 16 μ L、模板 DNA 2 μ L。

1.9.2 实时荧光定量 PCR 反应条件。37 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s, 同时收集 FAM 荧光, 进行 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.9.3 检测质控。检测过程中分别设置阳性对照 (阳性菌株 DNA) 和空白对照 (无菌水)。

2 结果与分析

2.1 7.5% 氯化钠肉汤增菌 样品匀液在 7.5% 氯化钠肉汤中于 36.5 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h, 呈现混浊生长。

2.2 分离菌在 Baird - Parker 和血平板上的培养特性 在 Baird - Parker 平板上, 菌落直径为 2 ~ 3 mm, 颜色呈灰色至黑色, 边缘为淡色, 周围为一混浊带, 在其外层有 1 个透明圈。用接种针接触菌落时, 有似奶油至树胶样的硬度。在血平板上, 菌落较大, 圆形、光滑凸起、湿润、白色, 菌落周围可见完全透明溶血圈。

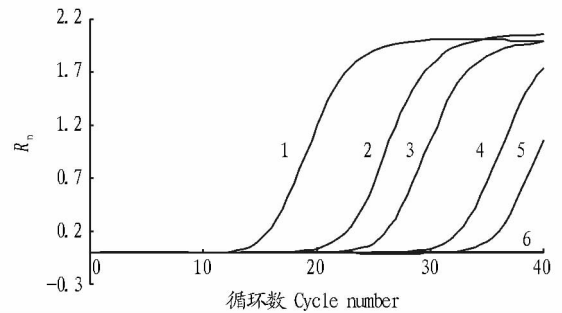
2.3 分离菌的革兰氏染色特征 革兰氏阳性球菌, 呈紫色, 圆形, 呈单个短链和葡萄串状排列, 无芽孢、无荚膜, 直径约为 0.5 ~ 1.0 μ m。

2.4 血浆凝固酶试验 标准阳性菌株和待检分离菌均使血浆凝固, 将试管倾斜或倒置时呈现凝块, 而阴性对照菌株和 BHI 肉汤空白培养基均无凝固现象, 因此判定分离菌株的血浆凝固酶试验为阳性。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 分别对分离培养检样的 7.5% 氯化钠肉汤增菌液、BHI 肉汤培养物、Baird - Parker 平板和血平板上的可疑菌落进行了实时荧光定量 PCR 检测, 阴性和阳性对照成立, 样品 Ct 值 $\leq$ 35.0, 判定样品检测结果均为阳性 (图 1)。

3 结论与讨论

笔者采用国家标准方法中选择性培养基细菌培养和分



注: 1. 阳性对照; 2. Baird - Parker 平板上菌落; 3. 血平板上菌落; 4. BHI 肉汤培养物; 5. 7.5% 氯化钠肉汤增菌液; 6. 空白对照 (无菌水)。

Note: 1. Positive control; 2. Colony on Baird-Parker agar plate; 3. Colony on blood plate; 4. Brain heart infusion (BHI) broth culture; 5. 7.5% sodium chloride broth culture; 6. Blank control (ddH₂O).

图 1 实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig. 1 The result of real-time fluorescent quantitative PCR

离、显微镜下形态学鉴定、溶血现象、血浆凝固酶试验等开展牛肉中金黄色葡萄球菌的检测, 分离鉴定出牛肉中金黄色葡萄球菌可疑菌落, 并运用实时荧光定量 PCR 方法进行了结果复核, 检测结果相一致, 确保了检测的准确性。陈丽丽等^[10]建立了金黄色葡萄球菌分离鉴定的质量控制方法, 采用血浆凝固酶试验、生化鉴定、实时荧光定量 PCR 等方法进行质控确证, 验证了 3 种试验方法检测结果的相关性, 试验表明菌株鉴定时可采取多种检测方法, 以提高检测结果的准确性。

为确保检测结果的准确性, 在实际检测工作中分离并鉴定金黄色葡萄球菌可疑样品时, 可采用不同的试验方法进行验证和复核, 该研究结果对畜禽肉中致病菌的准确检测具有参考价值和指导意义。

参考文献

- [1] 孙燕萍. 对畜禽生肉及养殖环境表面分离的金黄色葡萄球菌的药敏分析[J]. 中国药物经济学, 2015(3): 178 - 179.
- [2] 郑向梅, 吕均, 李玉芳, 等. 规模化养猪场金黄色葡萄球菌污染状况调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(12): 2986 - 2987.
- [3] 李娇, 董庆利, 陆柏益, 等. 国内外原料乳中金黄色葡萄球菌风险评估研究综述[J]. 乳业科学与技术, 2015, 38(1): 26 - 31.
- [4] 周少君, 梁辉, 朱海明, 等. 广东省熟肉制品中金黄色葡萄球菌的污染调查及初步风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 496 - 500.
- [5] 李苗云, 惠利娜, 赵改名, 等. 荧光定量 PCR 检测生鲜猪肉中金黄色葡萄球菌的应用研究[J]. 河南农业大学学报, 2014, 48(4): 475 - 480.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789. 10—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] 姜侃, 吕沁风, 汪新, 等. 三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 182 - 187.
- [8] 刘真真, 林涛, 李光伟, 等. 金黄色葡萄球菌不同培养与反应条件对其血浆凝固酶的影响[J]. 检验检疫科学, 2005(5): 34 - 35.
- [9] 国家认证认可监督管理委员会. 食品中致病菌检测的方法 实时 PCR 法: SN/T 1870—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] 陈丽丽, 刘丽萍, 徐岚. 镇江市食源性金黄色葡萄球菌检测质量控制研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(5): 655 - 657.