

- [9] Hoehne M, Schreier E. Detection of *Norovirus* genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe[J]. BMC Infectious Disease, 2006, 6(1):69.
- [10] Dreier J, Stormer M, Maede D, et al. Enhanced reverse transcription-PCR assay for detection of *Norovirus* genogroup I [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2714-2720.
- [11] Jan V, Marion P K. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1996, 174(3):610-615.

研究报告

Baird-Parker 琼脂上被抑制的金黄色葡萄球菌的筛选与特征研究

于海瑶^{1,2}, 骆海朋², 任秀², 张庆生², 丁宏², 孟庆群¹, 王玉杰¹, 雷晓利¹, 崔生辉²

(1. 吉林省长春市食品药品检测中心, 吉林 长春 130012;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 对在 Baird-Parker 琼脂平板上被抑制的金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)的遗传特征进行深入研究, 并提出针对性检验措施。方法 通过对 127 株不同来源的金葡菌和 8 株金葡菌标准菌株在 Baird-Parker 琼脂平板上进行测试, 筛选在 Baird-Parker 琼脂平板上被抑制的金葡菌, 并对菌株的遗传特征进行分析, 同时检测 Baird-Parker 琼脂平板中的抑菌成分对金葡菌的抑制作用。结果 3 株分离自北京猪肉馅中的菌株和金葡菌标准菌株(CMCC 26112)在 Baird-Parker 琼脂上生长率低于万分之一, Baird-Parker 琼脂基础培养基中添加甘氨酸(12.0 g/L)可明显抑制这 4 株金葡菌的生长, 而六水合氯化锂(5.0 g/L)、丙酮酸钠(10.0 g/L)和卵黄亚碲酸钾(50 ml)的添加对这 4 株金葡菌的生长没有明显影响; 这 4 株菌在高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上的生长率均高于 60%; 脉冲场电泳(PFGE)分析发现, 北京来源的 3 株金葡菌为同一 PFGE 型别, 与标准菌株(CMCC 26112)存在明显差异。结论 为保证食品安全国家标准检验方法 GB 4789.10—2010 对不同金葡菌计数的覆盖性, 计数检验过程中应使用两种或两种以上金葡菌选择性平板。

关键词:金黄色葡萄球菌; Baird-Parker 琼脂; 计数; 生长抑制; 筛选; 特征; 检验方法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)01-0051-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.01.011

Screening and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates inhibited on Baird-Parker agar

YU Hai-yao^{1,2}, LUO Hai-peng², REN Xiu², ZHANG Qing-sheng², DING Hong²,

MENG Qing-qun¹, WANG Yu-jie¹, LEI Xiao-li¹, CUI Sheng-hui²

(1. Jilin Province Inspection Center for Food and Drug, Jilin Changchun 130012, China;

2. National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To characterize the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolates that were inhibited on Baird-Parker agar and propose the possible solutions for the enumeration of these isolates. **Methods** The isolates inhibited on Baird-Parker agar were identified from 127 *S. aureus* isolates from different sources and eight *S. aureus* reference strains. The characteristics of these isolates were analyzed and the inhibitory effects of the components in Baird-Parker were determined. **Results** Three *S. aureus* isolates from the ground pork samples in Beijing and a reference strain *S. aureus* (CMCC 26112) showed poor growth on Baird-Parker agar. The glycine (12.0 g/L) in the Baird-Parker agar could inhibit the growth of these four isolates, and the supplement of sodium pyruvate, lithium chloride and egg yolk potassium tellurite didn't inhibit the growth of these isolates. These four isolates showed over 60% growth rate on mannitol salt agar and chromogenic agar. The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) showed that three isolates from Beijing had the same PFGE pattern which was significantly different from the pattern of (CMCC 26112). **Conclusion** To guarantee the good coverage of the national

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 北京市科学技术委员会基金课题 (D161100002116003)

作者简介: 于海瑶 女 助理工程师 研究方向为食品微生物检测 E-mail: yuhaiyao11@126.com

通信作者: 崔生辉 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: cuiyshenghui@aliyun.com

food safety standard GB 4789. 10-2010 on *S. aureus*, two or more categories of agar plates should be used in the *S. aureus* enumeration of food samples.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Baird-Parker agar; enumeration; growth inhibition; screening; characterization; test method

金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)是世界范围内引起社区人群食物中毒的重要食源性病原菌之一,该菌多是通过养殖、种植、屠宰、加工等环节的交叉污染,进入食品生产企业、餐饮单位和家庭厨房等场所伺机污染即食食品,并在适宜条件下产生金葡菌肠毒素而引起个体发病。鉴于金葡菌是全球食物中毒暴发最为常见的致病菌之一^[1-2],2013年实施的 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》^[3]中,对金葡菌在 11 类食品中的污染限量均进行了规定,且在该标准中指定金葡菌的检测方法为 GB 4789. 10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[4]中的第二法。在 GB 4789. 10—2010 第二法中,直接将食品均质液涂布于 Baird-Parker 琼脂平板上进行培养计数,而后用血浆凝固酶试验对可疑菌落进行确认。虽然 Baird-Parker 琼脂用于金葡菌的检测已有数十年的历史^[5-7],是目前大量国际规范中常用的金葡菌检测用培养基,但金葡菌的种内构成极其复杂,即使在生化表型上,不同的金葡菌也存在很大的差异,仅仅依赖 Baird-Parker 琼脂平板法,难免会出现漏检的风险。鉴于 GB 4789. 10—2010 是我国强制执行食品安全国家标准检验方法,其特异性和灵敏度会严重影响不同种类食品安全检验结果的获取与应用,不同研究机构针对 Baird-Parker 琼脂在食品中金葡菌计数检验方法进行了深入的对比研究^[8-9]。

本研究通过对不同来源收集的金葡菌在 Baird-Parker 琼脂平板上的生长率进行分析,发现少数金葡菌菌株在该平板上几乎不能生长,并针对这些菌株的遗传特征进行了深入研究,提出针对这类菌株检验的实用措施。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究使用 127 株从北京、陕西、广东等地区肉馅中分离的金葡菌(见表 1)和 8 株金葡菌标准菌株(CMCC 26112、ATCC 29213、CMCC 26003、ATCC 29213、ATCC 26111、NCTC 10708、ATCC 25923 和 CMCC 26079,均购自中国食品药品检定研究院)进行分析研究。

表 1 试验用金葡菌菌株信息

Table 1 Information of *Staphylococcus aureus* strains for testing

菌株来源	地区	菌株数/株
猪肉	北京	96
猪肉	陕西宝鸡	14
猪肉	陕西汉中	9
鸡肉	陕西渭南	4
鸡肉	广东广州	4

1.1.2 主要仪器与试剂

恒温培养箱、全自动微生物螺旋加样系统(西班牙 IUL)、恒温培养箱、高压灭菌器;胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、水解酪蛋白(MH)培养基、Baird-Parker 琼脂、胰蛋白胨、酵母粉、牛肉粉、卵黄亚碲酸钾、高盐甘露醇琼脂、琼脂均购自美国 BD,科马嘉显色琼脂(郑州博赛公司),血浆凝固酶(北京三药科技开发公司),API Staphy ID 鉴定条(北京威泰克公司),PCR 检测用相关试剂(大连宝生生物科技有限公司),甘氨酸、氯化锂、丙酮酸钠,*Sma* I 限制性内切酶(New England Biolab 北京有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡菌的筛选

取 127 株不同来源金葡菌和 8 株标准菌株的新鲜 MH 平板培养物,用无菌生理盐水将培养物调成 1.0 MCF 菌悬液,并对菌悬液进行梯度稀释,选取浓度约为 1.0×10^4 CFU/ml 菌悬液作为待测液,用螺旋涂布仪分别在 Baird-Parker 琼脂和 TSA 平板上进行涂布,于 36 °C 培养 22 ~ 48 h 后,按 GB 4789. 28—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》^[10]中推荐方法计算不同菌株的生长率。

1.2.2 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡菌的确认

对生长率不足 0.7% 的菌株用 1.2.1 方法重新测试进行确认,而后对筛选出的在 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡菌用血浆凝固酶、API Staphy ID 鉴定条和 PCR 方法扩增 *nuc* 作进一步种属确认^[11],将确认后的菌株均于 -80 °C 储存备用。

1.2.3 Baird-Parker 琼脂中不同抑菌成分的筛选

参照 GB 4789. 10—2010^[4]中 Baird-Parker 琼脂培养基制备方法,以胰蛋白胨(10 g/L)、酵母粉(1.0 g/L)、牛肉粉(5.0 g/L)和琼脂(20 g/L)作为基础培养基,分别依次添加甘氨酸(12.0 g/L)、六水合氯化锂(5.0 g/L)、丙酮酸钠(10.0 g/L)和

卵黄亚碲酸钾(50 ml),并调节 pH 至(7.0 ± 0.2),制备测试用培养基。取 1.2.2 方法确认的在 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌新鲜 MH 平板培养物,按 1.2.1 方法测试不同菌株在不同测试培养基上的生长率。

1.2.4 最低抑菌浓度(MICs)的测定

参考 CLSI 2015 版推荐的肉汤和琼脂稀释法^[12],测定在 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌菌株对 Baird-Parker 琼脂中不同抑菌成分的 MICs 值,质控菌株为金葡萄菌(ATCC 29213)。

1.2.5 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌特征分析

依照 1.2.1 方法,对筛选出的在 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌在高盐甘露醇和金葡萄菌显色平板上进行生长率测试。参照文献[13]推荐的金葡萄菌脉冲场电泳(PFGE)分型的方法,用 *Sma* I 限制性内切酶对所有在 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌进行分型,并将 PFGE 图像导入 BioNumerics 4.0 软件进行同源性聚类分析。

2 结果

2.1 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌的筛选

通过对 127 株不同来源的金葡萄菌和 8 株标准菌株进行测试,发现 3 株分离自北京猪肉馅中的菌株

和金葡萄菌标准菌株(CMCC 26112)在 Baird-Parker 琼脂上生长率低于万分之一,其余 131 株菌在 Baird-Parker 琼脂上的生长率均高于 10%,具体 VITEK 结果见表 2。

表 2 筛选出的被抑制菌株信息及 VITEK 检定结果

菌株编号	来源分离培养基	来源	VITEK 检定结果
FC 3405	血平板	北京猪肉馅	<i>Staphylococcus aureus</i>
FC 3407	血平板	北京猪肉馅	<i>Staphylococcus aureus</i>
FC 3408	血平板	北京猪肉馅	<i>Staphylococcus aureus</i>
CMCC 26112	血平板	标准菌株	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 29213	血平板	标准菌株	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 26003	血平板	标准菌株	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.2 Baird-Parker 琼脂培养基中各组分对金葡萄菌生长的影响

对 4 株在 Baird-Parker 琼脂培养基上被抑制金葡萄菌进行测试发现,Baird-Parker 琼脂基础培养基中添加甘氨酸(12.0 g/L)可明显抑制这 4 株金葡萄菌的生长。通过测试发现,在 Baird-Parker 琼脂基础培养基中,甘氨酸对 4 株金葡萄菌的 MICs 值均为 12.0 g/L。而六水合氯化锂(5.0 g/L)、丙酮酸钠(10.0 g/L)和卵黄亚碲酸钾(50 ml)的添加对这 4 株金葡萄菌的生长没有明显影响,见表 3。

表 3 Baird-Parker 琼脂培养基中各组分对金葡萄菌生长的影响

Table 3 Effect of different components in Baird-Parker agar for the growth of *Staphylococcus aureus*

培养基种类	菌落数量/(CFU/50 ml)				
	FC 3405	FC 3407	FC 3408	CMCC 26112	ATCC 29213
TSA	1.29 × 10 ⁵	6.48 × 10 ⁴	1.43 × 10 ⁵	1.11 × 10 ⁵	1.30 × 10 ⁵
基础*	1.30 × 10 ⁵	5.68 × 10 ⁴	1.29 × 10 ⁵	1.12 × 10 ⁵	1.18 × 10 ⁵
基础 + 氯化锂	0.94 × 10 ⁵	5.24 × 10 ⁴	0.98 × 10 ⁵	1.02 × 10 ⁵	1.37 × 10 ⁵
基础 + 丙酮酸钠	1.02 × 10 ⁵	4.32 × 10 ⁴	1.11 × 10 ⁵	0.99 × 10 ⁵	1.34 × 10 ⁵
基础 + 亚碲酸钾	1.03 × 10 ⁵	4.67 × 10 ⁴	0.95 × 10 ⁵	0.91 × 10 ⁵	1.05 × 10 ⁵
基础 + 丙酮酸钠 + 氯化锂 + 亚碲酸钾	0.93 × 10 ⁵	6.52 × 10 ⁴	1.01 × 10 ⁵	0.92 × 10 ⁵	1.31 × 10 ⁵
基础 + 甘氨酸	2	未见生长	未见生长	1	1.31 × 10 ⁵
Baird-Parker 琼脂培养基	4	1	4	4	1.31 × 10 ⁵
高盐甘露醇琼脂	1.21 × 10 ⁵	4.63 × 10 ⁴	1.40 × 10 ⁵	1.01 × 10 ⁵	1.24 × 10 ⁵
科马嘉显色平板	1.10 × 10 ⁵	4.31 × 10 ⁴	1.41 × 10 ⁵	1.05 × 10 ⁵	1.17 × 10 ⁵

注: * 为由 Baird-Parker 琼脂的基础成分构成:胰蛋白胨(10 g/L)、酵母粉(1.0 g/L)、牛肉粉(5.0 g/L)和琼脂(20 g/L)

2.3 Baird-Parker 琼脂上被抑制金葡萄菌特征分析

对 4 株在 Baird-Parker 琼脂培养基上被抑制金葡萄菌进行测试发现,4 株菌在高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上的生长率均高于 60%。通过对这 4 株菌进行 PFGE 分析发现,北京猪肉馅来源的 3 株金葡萄菌 FC 3405、FC 3407、FC 3408 为同一 PFGE 型别,其 PFGE 图谱与标准菌株(CMCC 26112)存在明显差异,见图 1。

3 讨论

本研究通过对 127 株不同来源的金葡萄菌和 8 株

标准菌株进行测试,发现 3 株分离自北京猪肉馅中的菌株和金葡萄菌标准菌株(CMCC 26112)在 Baird-Parker 琼脂上生长率低于万分之一,分析 Baird-Parker 琼脂的组分,发现这一抑制作用是由于甘氨酸(12.0 g/L)浓度达到这 4 株菌的 MICs 值造成的,但 4 株菌在高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上的生长率均高于 60%。本研究结果对未来 GB 4789.10—2010 标准的修订提供了有力的数据支持。

近年金葡萄菌分子流行病学的研究显示,金葡萄菌的种内构成极其复杂,目前已识别的多位点序列分

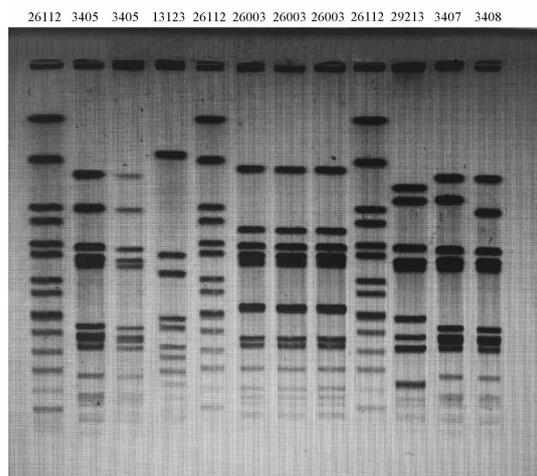


图1 北京猪肉馅来源的3株金葡萄菌与标准菌株的PFGE图谱

Figure 1 PFGE profiles of a standard strain and three strains of *Staphylococcus aureus* from pork samples in Beijing

型有两千余个 (<http://saureus.mlst.net/>)^[14], 即使在生化表型上, 不同的金葡萄菌也存在很大差异。作为一个强制性的食品安全国家标准检验方法, GB 4789.10—2010 仅使用一种金葡萄菌选择性培养基进行食品中金葡萄菌计数检验的准确性亟待深入验证。在本研究中, Baird-Parker 琼脂用于金葡萄菌的检测就有 2.96% 的假阴性率。张琳等^[15] 亦发现, 即使 Baird-Parker 平板上的典型菌落, 其血浆凝固酶阳性率也仅为 66%, 而当非金葡萄菌浓度过高时, 目的菌可能被覆盖而难以计数, 使检测难度增加, 并且也加大了漏检导致公共卫生事件暴发的风险。本研究中发现 4 株金葡萄菌可被 Baird-Parker 琼脂明显抑制, 这进一步说明金葡萄菌种内的复杂性, 而这 4 株菌在高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上均生长良好。

作为金葡萄菌选择性计数平板, Baird-Parker 琼脂中的蛋白胨、牛肉提取物和酵母提取物为微生物生长提供了氮源、碳源等必要营养, 丙酮酸钠在不破坏培养基选择性的前提下可刺激金葡萄菌的生长, 而亚硝酸钾、甘氨酸和氯化锂为该琼脂中的选择性成分。本研究显示, Baird-Parker 琼脂中甘氨酸的使用浓度 (12.0 g/L) 可抑制 4 株金葡萄菌的生长。文献报道显示^[16-17], 甘氨酸是通过干扰细胞壁的合成而抑制微生物的生长, 虽然金葡萄菌对甘氨酸较其他微生物耐受能力较强, 但过高的浓度仍可抑制金葡萄菌生长。本研究结果显示, 由于金葡萄菌种内遗传分类的多样性, 该种内存在少量菌株对甘氨酸较为敏感, 在 Baird-Parker 琼脂中甘氨酸的使用浓度 (12.0 g/L) 条件下生长被抑制。通过 PFGE 分析显示, 这类菌株并非单独的一个克隆, 而是有不同的

遗传背景。但这类菌株的共同特点是可在不同于 Baird-Parker 琼脂上, 诸如高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上生长良好。以上结果提示在食品中金葡萄菌计数检测时, 为保证国标方法对金葡萄菌计数检出的广泛性, 应使用配方原理不同的两种或两种以上选择性平板对金葡萄菌进行计数检验。

综上, 本研究结果明确指出食品安全国家标准 GB 4789.10—2010 中使用单一选择性计数平板对食品中金葡萄菌进行检验存在明显的漏洞。为保证 GB 4789.10—2010 对不同金葡萄菌计数的覆盖性, 计数检验过程中应使用两种或两种以上金葡萄菌选择性平板。本研究结果对未来食品安全国家标准 GB 4789.10—2010 中金葡萄菌计数方法的修订提供了有力的数据支持。

参考文献

- [1] Harker K S, Lane C, Gormley F J, et al. National outbreaks of *Salmonella* infection in the UK, 2000-2011 [J]. *Epidemiology and Infection*, 2014, 142(3): 601-607.
- [2] Laufer A S, Grass J, Holt K, et al. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef-United States, 1973-2011 [J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(9): 2003-2013.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 29921—2013 食品安全国家标准 食品中致病微生物限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.10—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [5] Mitchell R G. Classification of *Staphylococcus albus* strains isolated from the urinary tract [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1968, 21(1): 93-96.
- [6] Devoyod J J, Millet L, Mocquot G. An agar medium for direct enumeration of *Staphylococcus aureus*: pork plasma medium for *S. aureus* (PPSA) [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1976, 22(11): 1603-1611.
- [7] Klapes N A. Comparison of Vogel-Johnson and Baird-Parker media for membrane filtration recovery of *Staphylococci* in swimming pool water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 46(6): 1318-1322.
- [8] 蔡双福, 周芳梅, 伍笑平. 食品中金黄色葡萄球菌计数方法的比较研究 [J]. *现代食品科技*, 2010, 26(12): 1409-1411.
- [9] 梁景涛, 谢翊, 林秋芬, 等. 3 种食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(4): 790-791.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.28—2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [11] Merlino J, Watson J, Rose B, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(5): 793-801.
- [12] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility

- testing;twenty-fifth informational supplement[A]. PA,2015.
- [13] Bannerman T L, Hancock G A, Tenover F C, et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(3):551-555.
- [14] Aanensen D. Multi locus sequence typing (MLST) [DB/OL]. (2016-01-08)[2016-04-01]. <http://saureus.mlst.net/>
- [15] 张琳,李敏,于莉,等. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究[J]. 食品工业科技,2006,27(6):166-169.
- [16] Hammes W, Schleifer K H, Kandler O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan[J]. Journal of Bacteriology, 1973,116(2):1029-1053.
- [17] WONG C B, Khoo B Y, Sasidharan S, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by crude and fractionated extract from lactic acid bacteria[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(1):129-139.

· 公告 ·

总局办公厅关于印发食品补充检验方法工作规定的通知

食药监办科[2016]175号

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局,新疆生产建设兵团食品药品监督管理局,中国食品药品检定研究院:

为进一步加强食品补充检验方法管理,规范食品补充检验方法相关工作程序,根据《食品安全抽样检验管理办法》(国家食品药品监管总局令第11号),食品药品监管总局制定了《食品补充检验方法工作规定》。现予印发,请遵照执行。

食品药品监管总局办公厅
二〇一六年十二月二十三日

(相关链接: <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1605/168094.html>)

· 资讯 ·

印度发布了茶中添加铁的限制要求

2017年1月5日,印度食品安全及标准管理局(FSSAI)发布了2016食品安全和标准第14次修订最终法规的官方公报,公报中通报了茶中添加的铁限制要求为不超过250 mg/kg,相关要求自该官方公报发布之日起生效。

(摘自食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2017/01/412354.html>)