

金黄色葡萄球菌肠毒素检测的研究进展

云 盛 索晓敏 徐正挺 杨俊平 李宇星

(内蒙古巴彦淖尔市疾病预防控制中心 内蒙古 临河 015000)

摘要:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种重要的人畜共患致病菌,广泛存在于自然界中,其产生的肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SE)可通过污染食物而导致食物中毒。目前,随着人们对食品安全重视度的加深,国际上已将肠毒素的检测列入食品检验法规,因此建立灵敏、快速的肠毒素检测方法,是食品安全检测的一项重要研究内容。

关键词:肠毒素;食物中毒;检测方法

中图分类号:Q939.92,R378.11 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)19-3756-03

Recent Advance on the Detection of *Staphylococcus Aureus* Enterotoxins

YUN Sheng, SUO Xiao-min, XU Zheng-ting, YANG Jun-ping, LI Yu-xing

(Bayannaoer Center For Disease Control And Prevention in Inner, Mongolia, Linhe, 015000)

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is a major human and zoonotic pathogen widely spreading in the nature. It can produce staphylococcal enterotoxins (SE) and induce food poisoning. Detection of SE is listed in food safety inspection regulations with the improving of people's awareness about food safety. It is necessary to establish a rapid and sensitive method for detection of SE to insure food safety.

Key words: Staphylococcal enterotoxins; Food poisoning; Detection method

Chinese Library Classification: Q939.92, R378.11 **Document code:** A

Article ID :1673-6273(2012)19-3756-03

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起食品污染和细菌性食物中毒的一种重要细菌,广泛存在于空气、水以及人畜排泄物中^[1]。近年来对食源性疾病的分析发现,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒发生频率极高,主要是食用了被其产生的肠毒素污染的食品所造成的^[2]。金黄色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin, SE)是由金黄色葡萄球菌分泌的一组具有超抗原活性的细菌毒素,根据其抗原性可将其分为5个血清型:SEA、SEB、SEC、SED和SEE。近年来,新型的葡萄球菌肠毒素也相继被发现,如SEF^[3]、SEG、SEI^[4]、SEH^[5]等。在美国和加拿大,由SE引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的33%和45%,而我国每年发生的此类中毒事件也有很多^[6]。据估计,食入100 ng的SE即可出现食物中毒症状^[7]。因此,研究SE的快速检测方法,对于由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒的临床诊断以及预防该菌引起的食物中毒有重要意义。

近年来,每当发生肠毒素食物中毒时,卫生检疫部门就急需简便、经济、易操作的快速诊断试剂盒。目前对其主要检测方法有:动物学试验、免疫学试验、PCR技术、生物传感器方法以及根据其超抗原特性而建立的检测方法。

1 生物学检测

起初对于SE的检测主要是动物学方法,即采用相对对SE敏感的幼猫、猴等动物作为试验对象,通过喂食SE污染的食物,观察其可能出现的各种异常生理形态变化,来判断待测物中是否存在SE。动物学试验由于实验动物来源困难,且操作繁

琐、特异性不高、灵敏度亦低等原因限制了其应用推广。1997年,Rasooly等^[8]采用兔血T细胞代替试验动物,进行体外检测生物活性的方法,灵敏度可达1 pg/mL,克服了以前动物实验法不能定量、低灵敏度和高成本等缺点。

2 免疫学方法

免疫学方法是以SE作为抗原,通过与其特异性抗体发生结合反应,来检测样品中的是否还有金黄色葡萄球菌肠毒素,主要包括以下几种。

2.1 免疫琼脂扩散法

免疫琼脂扩散法是较早用于检测SE的一种免疫学方法。其原理是利用可溶性抗原与抗体在半固体琼脂内进行扩散,若抗原与抗体反应,且比例合适,就会出现白色沉淀线的阳性反应。此法主要分为单向琼脂扩散试验和双向琼脂扩散试验,特点是操作简便,但这两种方法的检测灵敏度低,通常只能达到300~500 ng/mL的水平^[9]。因此在检测SE时,必须对样品进行浓缩或提纯毒素浸出液,且该方法易受温度、pH、盐浓度和扩散时间等各种条件的影响。尽管后期有人在此方法的基础上进行了相应的改进,如适宜灵敏度法、电泳免疫扩散法、微量玻片法等,但灵敏度仍然不高。

2.2 凝集试验

凝集试验的基本原理是在适当大小的颗粒载体表面吸附上抗体,然后与相应抗原作用,在适宜电解质存在的条件下,出现特异性凝集现象。目前在肠毒素检测中应用较多的主要有反向间接血凝试验(RIHA)和反向被动乳胶凝集试验(RPLA),这两种方法原理相同,都是先将各型SE抗体吸附或偶联于红血球表面或乳胶颗粒上,然后再加入被检的含有相应SE的样品,

作者简介:云盛(1985-),男,本科,检验师,主要从事微生物检验。
E-mail:yunsheng8585@163.com

(收稿日期:2011-10-13 接受日期:2011-11-10)

出现凝集现象即为阳性。这两种方法不但具有很好的敏感性,而且操作简单、快速,很适合基层医院、商检和防疫部门使用。

2.3 免疫标记法

免疫标记法是将抗原抗体反应和标记技术结合起来应用于检测抗原或抗体的方法,即用带有检测信号的追踪物来标记抗原或抗体,如荧光素、放射性同位素、酶、生物素及化学(或生物)发光剂等,然后进行反应,再借助精密仪器对实验结果直接进行镜检观察或自动化分析测定。主要包括反射免疫法、酶联免疫法、免疫荧光法和免疫印迹法。

放射免疫测定法(RIA)是根据标记抗原和非标记抗原对特异性抗体的竞争性反应,将放射性同位素标记到特异性抗体上,用于检测未知样中SE。1975年,Bukovic^[10]采用RIA法测定食品中SE的灵敏度为1~10 ng/g,灵敏度高、特异性强,但由于存在放射性污染,因而不被广泛采用。

酶联免疫法(ELISA)是利用具有催化底物显色的酶来标记抗原或抗体,在固相载体上进行抗体或抗原的测定。Simon于1796年首次使用该方法检测SE。目前该方法能检测到的SE最低浓度已达到1 ng/mL左右,已有商品化的ELISA试剂盒,用于检测SEA、SEB、SEC、SED和SEE等。ELISA方法是一种敏感、快速、简单的方法,尽管有不少的局限性,但在SE的检测方面仍应用最广。

免疫荧光法(IFA)以荧光素标记的已知抗体(或抗原)作为探针,检测待测细胞、组织标本中的靶抗原(或抗体)。2003年,Khan等^[11]用此法检测SEB,灵敏度高,检测时间短,比常规的ELISA法快4倍左右。随后Alefantis等^[12]又开发了一种免疫双抗夹心荧光法用于快速检测SE。该方法优点在于能比较快速地测出少量抗原或抗体在细胞内或组织内的定位及分布,并且也是测定血清抗体的一种比较敏感的方法。

免疫印迹技术(IBT)建立于1976年,是一种借助特异性抗体鉴定抗原的有效方法,具有高特异性和敏感性的特点。Rasooly等^[13]采用了该法检测食品中的SEA,待测样品只需要经过简单的均质,不要额外的溶解和预处理就可以进行检测,该方法的最低检测水平为100 pg/mL。同ELISA相比,该技术既能检测经过热处理的食品中的肠毒素,又可以避免交叉反应的发生,是要优于ELISA的^[14]。但该法中的印迹转移电泳步骤复杂,对缓冲液的pH值有严格的要求。

胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标记物,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。宋农等^[15]首次将胶体金技术用于SE的检测。胶体金具有高电子密度、介电特性和催化作用,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性,具有简单、快速、稳定、准确性好和无污染等优点。

3 分子生物学法

PCR是80年代中期发展起来的体外核酸扩增技术,具有快速、简便、特异、敏感、易自动化等优点,可从基因水平进行诊断并同时可检测大量样品,在基础研究、临床及法医学有着广泛的应用。近年来有很多学者将其用于SE的检测。Johnson等^[16]首先设计八对引物利用PCR技术对样品中的SE进行鉴定,分离到了产A~E型葡萄球菌肠毒素以及产中毒性休克综

合毒素-1(TSST-1)和表皮剥脱毒素A和B的葡萄球菌88株。Omoe等^[17]利用多重PCR进行肠毒素基因分布试验,分离出了不止一种肠毒素基因。Letertre等^[18]则利用实时荧光PCR成功检测出了肠毒素SEA-SEJ共9种基因。PCR技术的出现为快速、精确地检测毒素提供了一种新的方法。

4 生物传感器技术

生物传感器(biosensor)是利用物理化学仪器将生物的生命活动和生化反应,与换能器相接,以电的形式表现出来。它主要是将生物活性物质专一识别功能产生的特异性和生物反应讯号放大的高度敏感性结合起来。具有检样量少、分析速度快、生物功能膜可多次使用等优点,能用于多种物质的检测。目前,用于SE检测的生物传感器主要有电化学免疫传感器、光学生物传感器和压电晶体免疫传感器等。King等^[19]采用自动光导纤维型生物感应器对样品中的SEB进行了检测,检测范围达到5~200 ng/mL,该方法排除了泥土和花粉等固体干扰物的干扰。Homola等^[20]用表面质粒共振生物传感器(SPR)检测牛奶样品中的SEB,最低检测限可达到0.5 ng/mL,实现了对SEB的实时监控。高志贤等^[21]研制出了压电免疫传感器,能用于液体中SE的检测。左佳在电化学生物传感器的基础上引入了胶体金探针放大系统,研制出了胶体金放大型SEB电化学生物传感器,该技术灵敏度高,特异性强^[22]。

5 超抗原技术

SE作为一种超抗原,极少量的SE就可以激活大量T淋巴细胞的增殖并产生针对SE的细胞因子。SE对抗原的激活不需抗原呈递细胞(APC)的参与,直接与APC的主要组织相容性复合物(MHC)类分子结合,再与T细胞受体(TCR)的V β 结合后,可激活T细胞增殖并释放大量细胞因子^[23]。Hawryluk等^[24]采用了超抗原技术检测SEA,这种方法基于SEA诱导的T淋巴细胞对于SEA-bound Raji细胞的毒性作用,对死亡的靶细胞进行比色分析进行检测,灵敏度很高,可达10~12 pg。

金葡萄球菌肠毒素已被视为食物中毒的主要因素之一,引起世界各国的普遍关注,同时SE还引起或参与其他一些疾病,包括肠炎、败血症、皮肤感染或中毒性休克,其污染造成的突发公共事件也一直困扰着人们,对人类健康、社会经济发展的威胁越来越大,造成的损失也越来越大。因此,建立特异性和敏感性均佳且快速经济适用的肠毒素检测方法,以及开展SE的有效预防和治疗工作,将是今后针对SE研究的重点。

参考文献(References)

- [1] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 61: 1-10
- [2] 章乐怡, 李毅, 马雪莲. 食物中毒及食品中金黄色葡萄球菌的肠毒素及基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19: 2851-2853
Zhang Le-yi, Li Yi, Ma Xue-lian. Research of enterotoxin and its gene in Staphylococcus aureus strains isolated from food poisoning and food samples [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19: 2851-2853
- [3] 柳旭伟, 葛文霞. 金黄色葡萄球菌肠毒素[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(5): 86-89

- Liu Xu-wei, Ge Wen-xia. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(5): 86-89
- [4] Munson S H, Tremaine MT, Betley M J, et al. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(7): 3337-3348
- [5] Ren K, Banan J D, Pancholi V, et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin [J]. *Exp Med*, 1994, 180(5): 1675-1683
- [6] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14: 392-395
- Li Yi. Advancement in researches of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2004, 14: 392-395
- [7] Jorgensen H J, Mork T, Hogasen H R, Rorvik L M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway [J]. *Appl Microbiol*, 2005, 99: 158-160
- [8] Rasooly L, Rose N R, Shah D B, Rasooly A. In vitro assay of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A activity in food [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2361-2365
- [9] 王小红, 谢笔钧, 史贤明. 食品中金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法的研究进展 [J]. *山西食品工业*, 2003, 3: 39-42
- Wang Xiao-hong, Xie Bi-jun, Shi Xian-ming. Research Advances in Determination Methods of staphylococcal enterotoxin in food [J]. *Shanxi Food Industry*, 2003, 3: 39-42
- [10] Bukovic J A, Johnson H M. Staphylococcal enterotoxin C: solid-phase radioimmunoassay [J]. *J Appl Microbiol*, 1975, 30: 700-701
- [11] Khan A S, Cao C J, Thompson R G, Valdes J J. A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. *Mol Cell Probe*, 2003, 17: 125-126
- [12] Alefantis T, Grewal P, Ashton J, Khan A S, Valdes J J, Vecchio V G. A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-throughput screening [J]. *Mol Cell Probes*, 2004, 18: 376-382
- [13] Rasooly A, Rasooly R S. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 3(14): 205-212
- [14] Bennett R W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(6): 1264-1270
- [15] 宋农, 李君文, 王新为, 古长庆. 胶体金免疫层析法用于产肠毒素葡萄球菌快速检测的研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(7): 1-5
- Song Nong, Li Jun-wen, Wang Xin-wei, Gu Chang-qing. Study of Gold Immunoassay Assay in the rapid detection of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2003, 26(7): 1-5
- [16] Johnson W M, Tyler S D, Ewan E P, Ashton F E, Pollard D R, Rozee K R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction [J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 426-430
- [17] Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D L, Ueda S, Shinagawa K. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 3: 857-862
- [18] Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes sea to sej [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17(4): 139-147
- [19] King K D, Anderson G P, Bullock K E, Regina M J, Saaski E W, Ligler F S. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 1999, 14: 163-170
- [20] Homola J, Dostalek J, Chen S, Rasooly A, Jiang S, Yee S S. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 75: 61-69
- [21] 高志贤, 陶桂全, 张超, 等. 压电免疫传感器检测牛奶中 C 型葡萄球菌肠毒素的初探 [J]. *中国食品卫生杂志*, 1996, 8(6): 17-20
- Gao Zhi-xian, Tao Gui-quan, Zhang Chao, et al. Preliminary Studies on a piezoelectric immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin C in milk [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 1996, 8(6): 17-20
- [22] 左佳. 胶体金放大型葡萄球菌 B 型肠毒素生物传感器的研制 [D]. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2009
- Zuo Jia. Study of Biosensor Based on Colloidal Gold Amplifying for Detection of the *Staphylococcus Enterotoxin B* [D]. [Master's Degree Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural university library, 2009
- [23] 任天红, 刘景武, 付素兰. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法的应用及进展 [J]. *河北医药*, 2008, 30: 1224-1226
- Ren Tian-hong, Liu Jing-wu, Fu Su-lan. Application and Development of staphylococcal enterotoxin Detecting Methods [J]. *Hebei Medical Journal*, 2008, 30: 1224-1226
- [24] Hawryluk T, Hirshfield I. A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A [J]. *J Food Protect*, 2002, 65: 1183-1187

更正声明

作者李牧发表于我刊 2012 年第 12 卷第 12 期论著文章 "微量元素锶对幼年自发性高血压大鼠血压升高的预防作用及其作用机制探讨" 中, 由于编辑工作疏漏, 第一作者李牧未标注单位, 我刊将于数据库收录时进行补充, 现更正如下:

李 牧¹ 杨佳琳¹ 杨庭树^{1Δ} 郭园园¹ 易 军¹ 李硕磊²

(1 解放军总医院心血管病中心南楼心一科 北京 100853 2 北京大学人民医院动物实验室 北京 100044)

特此更正

现代生物医学进展编辑部