

实验技术与方法

一种有效检测沙门菌的显色培养基的研究

刘振¹ 于奂¹ 肖强² 刘沛¹ 何艳玲¹ 李瑾¹

(1. 中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司, 北京 100025;

2. 江西师范大学, 江西 南昌 330013)

摘要:目的 研究一种显色培养基分离筛选沙门菌。方法 合成一种 C8 酯酶的显色底物研制检测沙门菌的显色培养基 CSA, 采用 116 株标准菌株试验以及按照 ISO 方法 (ISO 6579:2002) 对 342 份样品进行检测, 对比该显色培养基 CSA 与传统选择性培养基的选择性。结果 研制的显色培养基能有效检测包括伤寒、甲型副伤寒在内的沙门菌, 且灵敏度与特异性分别达到 100% 和 98.8%, 均明显高于传统沙门菌分离筛选的培养基。结论 研制的沙门菌显色培养基较传统选择性培养基在检测的灵敏度和特异性上均有很大的提高。

关键词:沙门菌属; 微生物学技术; 培养基

Study on High-Performance Chromogenic Media for Salmonella Detection

LIU Zhen, YU Huan, XIAO Qiang, LIU Pei, HE Yan-ling, LI Jin

(Beijing Landbridge Technical Co., Ltd. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: **Objective** To explore a novel chromogenic medium for screening of *Salmonella* spp. **Method** The substrate of the C8 esterase was synthesized, and the chromogenic salmonella agar (CSA) for detecting *Salmonella* spp. was developed. 116 standard strains were used to test the CSA. 342 food samples on sale were detected by CSA and other 3 kinds of traditional selective media in order to compare their selectivities, using the method of ISO (ISO 6579 2002). **Results** *Salmonella* spp. including *S. typhi* and *S. paratyphi A*, could be effectively detected by the CSA method. The sensitivity and specialty were 100% and 98.8%, and both were better than 3 kinds of traditional selective media. **Conclusion** It was concluded that the sensitivity and specialty of the CSA were greatly improved.

Key word: Salmonella; Microbiological Techniques; Culture Media

沙门菌是一种重要的食源性致病菌, 一直是世界公共卫生关注的问题^[1, 3]。传统培养方法筛选分离沙门菌一般利用其产 H₂S、不发酵乳糖等特征^[2, 11], 采用的培养基主要有 SS 琼脂 (Salmonella Shigella Agar)、HE 琼脂 (Hektoen Enteric Agar)、XLD 琼脂 (Xylose Lysine Deoxycholate Agar) 等, 这些培养基存在不足之处是有大量假阳性给实际检验带来繁重的工作量, 同时某些沙门菌如甲型副伤寒沙门菌产 H₂S 较弱, 在培养基上容易造成漏检^[4, 14]。

近些年来, 在分子生物学技术领域利用显色酶底物筛选重组克隆子的优点, 也带给微生物分离筛选方法一些启示^[3, 4, 13]。Rambach 琼脂就是一种最早利用显色酶底物与菌体代谢产生酶反应显色而筛选沙门菌的显色培养基, 其原理是利用沙门菌丙二醇阳性与半乳糖苷酶阴性等特点, 主要缺点是不能检测 *S. moscow*、*S. wassenar* 以及 *S. typhi* 等沙门菌^[2, 3, 7]。Ventitia M 等人通过研究肠道菌 C4 - C10

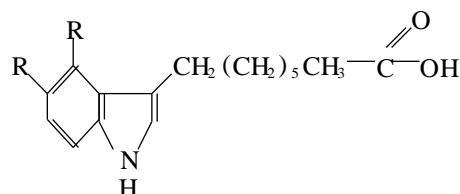
等酯酶的活性发现沙门菌 C8 水平上的酯酶具有高度的一致性^[6, 9, 10]。Aguirre 等^[14]人利用 C8 酯酶底物 4 - 甲基伞形酮 - 辛酯 (4 - methylumbelliferyl-caprylate) 进行 C8 酯酶斑点测试, 通过沙门菌 C8 酯酶水解底物观察荧光判别阳性培养物, 但存在荧光较弱时误判。

本研究利用新的 C8 酯酶显色底物研制出沙门菌显色培养基, 所配制的平板具有很高的灵敏性与特异性, 可以有效检测沙门菌, 包括伤寒、副伤寒沙门菌, 具有很高的特异性。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 C8 酯酶显色底物合成^[15], 结构式如下。



作者简介: 刘振 男 工程师

1.1.2 培养基制备 沙门菌显色培养基 CSA(北京陆桥技术有限责任公司自主研制),加热煮沸灭菌,灭菌后倾注平板,待培养基充分凝固后,放置冰箱避光冷藏备用。SS 琼脂 (Cat No. 211597)、XLD 琼脂 (Cat No. 295646) 和 HE 琼脂 (Cat No. 221365) 均购自

美国 BD 公司,配制按照厂家说明进行。营养肉汤 CM106,北京陆桥。

1.2 标准菌株 116 株标准菌株,包括 81 株沙门菌与 35 株非沙门菌见表 1。

表 1 116 株标准菌株在沙门菌显色培养基 CSA 上的显色反应

菌株名称	菌号	显色反应	菌株名称	菌号	显色反应	
沙门菌			非沙门菌			
<i>S. typhi</i>	50035	紫红色	<i>Escherichia coli</i>	44101	蓝绿色	
	50038	紫红色		44102	蓝绿色	
	50039	紫红色		44103	蓝绿色	
	50071	紫红色		44104	蓝绿色	
				44381	蓝绿色	
				1. 1017 ^a	蓝绿色	
<i>S. paratyphi A</i>	50001	浅紫红色		<i>Enterobacter cloacae</i>	45301	蓝绿色
	50002	浅紫红色			12021	蓝绿色
					ATCC10699 ^b	蓝绿色
		ATCC33457 ^b			蓝绿色	
<i>S. paratyphi B</i>	50004	紫红色		<i>Citrobacter freundii</i>	11732	蓝绿色
	50076	紫红色	48010		蓝绿色	
			48013		蓝绿色	
<i>S. enteritidis</i>	50040	紫红色	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46101	蓝绿色	
	50041	紫红色		46105	蓝绿色	
	50100	紫红色		46108	蓝绿色	
	50128	紫红色		46114	蓝绿色	
	50335	紫红色				
	50336	紫红色				
	50338	紫红色				
	50760	紫红色				
<i>S. typhimurium</i>	1. 1174 ^a	紫红色	<i>Enterobacter aerogenes</i>	45102	蓝绿色	
	1. 1190 ^a	紫红色		45103	蓝绿色	
	50115	紫红色		12022	蓝绿色	
	50220	紫红色				
	50707	紫红色				
	50709	紫红色				
	50712	紫红色				
	50222	紫红色				
<i>S. derby</i>	50112	紫红色	<i>Proteus mirabilis</i>	49003	无色	
	50320	紫红色		49005	无色	
	50718	紫红色		49106	无色	
	50719	紫红色				
	ATCC6960 ^b	紫红色				
<i>S. london</i>	50106	紫红色	<i>Providencia rettgeri</i>	ATCC14505 ^b	无色	
	50310	紫红色				
	50324	紫红色				
	50357	紫红色				
<i>S. arizonae</i>	47001	紫红色	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10101	无色	
	47002	紫红色		10116	无色	
	47003	紫红色		10211	浅绿色	
<i>S. choleraesuis</i>	50018	紫红色	<i>Pseudomonas alii</i>	11813	无色	
	50307	紫红色				
	50191	紫红色				
	50732	紫红色				
<i>S. dublin</i>	50042	紫红色	<i>Pseudomonas mendocina</i>	ATCC25411 ^b	无色	
	50761	紫红色				
	50104	紫红色				
	ATCC15478	紫红色				
	ATCC15480	紫红色				

续表 1

菌株名称	菌号	显色反应	菌株名称	菌号	显色反应
<i>S. pullorum</i> (n = 5)	ATCC13036 ^b	紫红色	<i>Staphylococcus aureus</i>	26112	生长抑制
	ATCC9120 ^b	紫红色		189	生长抑制
	ATCC10398 ^b	紫红色		26003	生长抑制
	ATCC19945 ^b	紫红色		ATCC27217 ^b	生长抑制
	C79 - 14 ^c	紫红色			
<i>S. hadar</i>	ATCC51956 ^b	紫红色	<i>Enterococcus faecalis</i>	32220	生长抑制
	ATCC51958 ^b	紫红色		32221	生长抑制
	50882	紫红色			
<i>S. anatum</i>	50083	紫红色			
	50353	紫红色			
	50774	紫红色			
<i>S. thompson</i>	50023	紫红色			
	50322	紫红色			
	50326	紫红色			
	50735	紫红色			
	50846	紫红色			
	50853	紫红色			
	50853	紫红色			
<i>S. infantis</i>	50204	紫红色			
	50341	紫红色			
	50348	紫红色			
	ATCC51741 ^b	紫红色			
<i>S. serjftenberg</i> (n = 4)	50050	紫红色			
	50201	紫红色			
	50315	紫红色			
	50913	紫红色			
<i>S. newport</i>	50029	紫红色			
	50124	紫红色			
	50321	紫红色			
<i>S. manhattan</i>	50151	紫红色			
	50152	紫红色			
	50380	紫红色			
	50825	紫红色			
	50827	紫红色			
<i>S. aberdean</i>	50107	紫红色			
	50312	紫红色			
	50786	紫红色			

注:1.“a”表示购自中国普通微生物菌种保藏中心;“b”表示购自美国典型培养物保藏中心;“c”表示国家兽医微生物菌种保藏中心;其他购自国家医学菌种保藏中心。2. 所有菌株的培养物均保存在含有 15%甘油的肉汤中,温度为-80。

1.3 试剂 诊断血清,泰国 S&A 公司。API 20E 生化试剂条,Biomerieux 公司。

1.4 检测样品 342 份检测样品均为市售的自然污染食品,种类包括生肉(牛肉、鸡肉、羊肉和猪肉)、鸡蛋、蔬菜、豆制品以及水果沙拉。

1.5 分析方法

1.5.1 标准菌株分析 将 -80 冰箱中保存的培养物接种至营养肉汤(CM 106,北京陆桥技术有限责任公司),(36 ±1) 培养 18~24 h 活化,活化后的菌株转种至制备好的培养基平板上置(36 ±1) 培养 24~48 h,观察结果,典型沙门菌的菌落在该平板上显(浅)紫红色,非沙门菌的细菌在该培养基上菌落呈蓝绿色、无色或生长受到抑制。

1.5.2 样品检测分析 按照 ISO 6579 2002 规定的程序^[8]进行样品制备和增菌培养,之后转接至制备好的平板上,挑取可疑沙门菌的菌落进行血清学试

验^[12](诊断血清,泰国 S&A 公司)以及生化鉴定试验(API 20E 生化鉴定条,Biomerieux)。可疑菌落形态为(浅)紫红色菌落,圆形突起。每个平板上挑取 5 个典型菌落进行试验,以血清学凝集反应阳性确证显色培养从样品中分离的可疑沙门菌,从而报告检测样品沙门菌阳性。

2 结果

2.1 标准菌株试验结果 (36 ±1) 培养至 36 h 时,所有沙门菌在显色培养基上的菌落均显现紫红色,颜色有深浅,包括伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌。铜绿假单胞菌在该培养基的菌落与沙门菌类似,但菌落颜色很浅,且室温放置 18~24 h 后,菌落周围产铜绿色素。革兰阳性菌在该培养基上生长受到抑制。

2.2 样品检测结果 342 份样品中经制备的平板

筛选后,对可疑沙门菌进行血清学试验,结果如表 2 所示,表明显色培养基上没有假阴性,灵敏度为 100%,基于该表中的数据,统计分析其特异性为 98.8%。其他 3 种培养基的灵敏度分别为:SS 琼脂 86.4%、HE 琼脂 82.6%、XLD 琼脂 86.4%;特异性指数分别为:SS 琼脂 93.6%、HE 琼脂 92.0%、XLD 琼

脂 94.4%。沙门菌显色培养基的假阳性菌株主要是铜绿假单胞菌,其他 3 种传统培养基均存在假阳性与假阴性的情况,造成假阳性的菌主要是 *Proteus mirabilis*,另外产 H₂S 较弱的沙门菌如 *S. typhi* 和 *S. paratyphi A* 等在检测中易出现假阴性造成漏检。

表 2 4 种培养基检测沙门菌的结果

样品	阳性与阴性样本数量							
	可疑沙门菌样品数(其中假阳性)				假阴性样品			
	SS	HE	XLD	CSA	SS	HE	XLD	CSA
肉(n=125)	15(10)	17(13)	13(8)	7(1)	1	2	1	0
禽蛋(n=85)	5(3)	5(3)	4(2)	3(0)	1	1	1	0
蔬菜(n=92)	12(8)	13(9)	12(8)	7(2)	1	1	1	0
豆制品(n=15)	4(1)	5(2)	4(1)	4(1)	0	0	0	0
水果沙拉(n=25)	2(0)	3(1)	2(0)	2(0)	0	0	0	0
总计(n=342)	38(22)	43(28)	35(19)	23(4)	3	4	3	0

3 讨论

利用 C8 酯酶显色酶底物研制的沙门菌显色培养基用于沙门菌检测,灵敏度与特异性均大大高于传统培养基。特别是该培养基能有效检测伤寒沙门菌(包括 *S. paratyphi A*)。在样品检验过程中我们发现传统培养基筛选沙门菌时,样品中带有 *Proteus mirabilis* 常会造成筛选结果假阳性,给后续生化与血清学试验带来繁重的工作量^[7,8]。*Proteus mirabilis* 在该显色培养基平板上的菌落为无色,沙门菌在该平板上形成清晰可见的(浅)紫红色菌落,且色泽在室温放置不会褪色,因而显色培养基可以将其与沙门菌有效区分。尽管铜绿假单胞菌在该培养基上菌落呈浅紫红色,但培养后放置室温一段时间(18~24 h)可以发现其产铜绿色素。同时,我们也验证了 4-甲基伞形酮-辛酯筛选沙门菌的效果,对比发现该显色底物对培养基的 pH 要求较为敏感,一般要求在碱性的环境,在紫外光(波长 = 365nm)下观察,弱荧光的培养物容易漏检,在实际检测过程需要配备荧光观察的装置。

参考文献

- [1] ALAIN RAMBACH. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 301-303.
- [2] ANNE-MARIE FREYDIERE, YVES GILLE. Detection of *Salmonellae* by using rambach agar and by a C8 esterase spot test [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2357-2359.
- [3] COOK V M, MILES R J, PRICE R G, et al. A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 807-812.
- [4] GAILLOT O, CAMILLO P, BERCHE P, et al. Comparison of

CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 762-765.

- [5] PEREZ J M, CAVALLI P, ROURE C, et al. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1130-1134.
- [6] MANAFI M. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests [J]. Int J Food Microbiol, 1996, 31: 45-58.
- [7] MANAFI M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 60: 205-218.
- [8] ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp [S].
- [9] MILES R J, SIU E L T. The detection of lipase activity in bacteria using novel enzyme substrates [J]. FEMS Microbiol Lett, 1992, 90: 283-288.
- [10] MOHAMMED MANAFI, WOLFGANG KNEIFEL, SHOSHANA BASCOMB. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics [J]. Microbiol Rev, 1991, 55: 335-348.
- [11] PERRY D F, Quiring C. Fundamental aspects of enzyme/chromogenic substrate interactions in agar media formations for esterase and glycosidase detection in *Salmonella* [J]. Zoopole, Ploufragan France, 1997: 63-70.
- [12] POPOFF M Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars [M]. 8th ed. Paris: WHO. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institute Pasteur, 2001.
- [13] RICHARDSON A C, COOKE V M. United Kingdom patent application 9802817.8 [Z]. 1998.
- [14] ROBERT CASSAR, PAUL CUSHIERI. Comparison of *Salmonella* chromogenic medium with DCLS agar for isolation of *Salmonella* species from stool samples [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 3229-3232.

[收稿日期: 2007-05-31]