

应用 MUCAP 试剂快速检测沙门氏菌

甄宏太 杨素贤 刘中学 苏庆 周云霞

(内蒙古进出口商品检验局 呼和浩特 010010)

摘要 报告了用 4-甲基伞形酮辛酯(4-Methylumbelliferyl-caprylate, MUCAP)快速检测沙门氏菌的特异性、敏感性和实用性。经 HE, DHL, SS 和麦康凯琼脂平板分离的 65 株沙门氏菌标准菌株和 48 株从食品中分离的沙门氏菌,用 MUCAP 测试均呈阳性反应;394 株非沙门氏菌中呈阳性反应的假单胞菌、气单胞菌、邻单胞菌可通过氧化酶试验与沙门氏菌区分开;与粘质沙雷氏菌的交叉反应改用加 1%蔗糖的分离平板也可排除。此方法的敏感性和特异性均达到 97%以上,而且操作简便、快速,数分钟内即可完成。

关键词 4-甲基伞形酮辛酯,辛酯酶,沙门氏菌

据 Manafi 等报道,沙门氏菌属(包括各亚属)均产生辛酯酶,这一性能是肠杆菌科除沙雷氏菌属外其他各属细菌所不具备的^[5],因此可作为鉴别沙门氏菌与肠杆菌科其他属细菌的一个试验项目。近来,Aguiarre, Ruiz, Manafi, Freydiere 等用意大利 Biolife 公司的试剂“MUCAP Test”测试肠杆菌科细菌、假单胞菌属、气单胞菌属和类志贺邻单胞菌,取得一万多个数据,证明该法对沙门氏菌有很高的敏感性和特异性,操作也十分简便,快速。为探讨这一方法的实用价值,由本试验室试制了 MUCAP 试剂,并用该试剂测试了有一定代表性的菌种和食物样品,取得较满意的结果,报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

91 株标准菌种得自中国医学微生物菌种保藏管理中心,另 87 株试验菌由本试验室分离。试验期间,将各菌种接种在普通琼脂半固体高层,胶塞封口,室温存放。临用前接种脑心肉汤,37℃培养 18~24h,再转种试验培养基。

1.2 培养基

胨水、四硫磺酸盐肉汤为商检研究所产品;HE、DHL、SS、麦康凯琼脂及各种生化培养基为上海生物制品研究所产品。为排除沙雷氏菌交叉反应,各琼脂平板培养基均补加 1%蔗糖。脂肪酶试验培养基由本试验室按常规法配制,即于普通琼脂内加 0.5%油脂(胡麻油或豆油、橄榄油、动物脂肪)和 0.006%维多利亚蓝,高压蒸气灭菌后制成斜面或平板。

1.3 试剂

4-甲基伞形酮辛酯(MUCAP, NP-10094-1),由本试验室制备,分装于安瓿瓶,每支

100mg,真空密封。使用前加 0.2ml 纤维溶解剂溶解,再加 Triton X-100 1.8ml,贮于冰箱。使用时用 pH5.0、0.1mol/L 醋酸盐缓冲液稀释 10 倍。

1.4 试验方法

1.4.1 用 MUCAP 测试辛酯酶:从脑心肉汤取试验菌,划线接种 HE、DHL、SS 和麦康凯琼脂平板,培养于 37℃ 温箱。自培养 12h 开始,每隔 2h 测试一次:选大小不同的单个菌落,用玻璃笔标记、编号后,加一滴或一接种环 MUCAP 试剂,随即在 365nm 紫外光照射下观察菌落是否显蓝色荧光。记录显光时间及亮度。

1.4.2 用油脂测试高碳脂肪酶:将被测菌接种在脂肪酶试验培养基上,37℃ 培养 48h。菌落及其周围培养基变蓝色或墨绿色为脂肪酶试验阳性。

1.5 样品检验

从猪肉、鸡肉下脚料和陈积的蔬菜各取 10 份样品,经胨水预增菌和四硫磺酸盐肉汤增菌培养后,接种 HE 和 SS 平板各两个,于 37℃ 培养 24~48h。挑取可疑沙门氏菌菌落,接种三糖铁琼脂斜面。将菌落作标记和编号后,滴加 MUCAP 试剂,在紫外光照射下观察 1~5min。对显蓝色荧光的菌落用氧化酶试纸条测试氧化酶反应。记录结果。待生化和血清学试验结束后,核定 MUCAP 试剂测试沙门氏菌的准确性。

2 结果

2.1 沙门氏菌测试结果

所试的 65 株沙门氏菌在 HE、DHL、SS 和麦康凯琼脂平板上生长的单个菌落,经 MUCAP 试剂测试,全部在 1~5min 内,在长波紫外光照射下显蓝色荧光(见表 1)。在不同培养基上所显荧光强度有差别,以麦康凯琼脂平板最强,SS 次之,HE 和 DHL 较暗,这与培养基的色调和菌落形成硫化铁的程度有关。荧光亮度与培养时间也有一定关系,刚长出的针尖大菌落加试剂后荧光隐约可见,随着培养时间的延长,荧光亮度逐渐增强。培养 24h 后,菌落无论大小,均呈现明显的蓝色荧光。不同菌株荧光有强弱之别,但弱者易于识别。

65 株沙门氏菌在加油脂和维多利亚蓝的培养基上,全部为高碳脂肪酶试验阴性(见表 1)。

2.2 非沙门氏菌试验结果

在上述四种平板上生长的 123 株非沙门氏菌,经 MUCAP 试剂测试呈阳性反应的有铜绿假单胞菌、嗜水气单胞菌、类志贺邻单胞菌和粘质沙雷氏菌(见表 1)。其中前三者均为氧化酶阳性,可与沙门氏菌区分开;沙雷氏菌在含蔗糖的平板培养基上生成不产硫化氢的糖发酵型菌落,与沙门氏菌(包括发酵乳糖产硫化氢的亚属Ⅲ)也有明显区别。

在所试非沙门氏菌中,除上述四种 MUCAP 试验阳性的菌株在含油脂和维多利亚蓝培养基上生成蓝色或墨绿色菌落外,还有 34 株变形杆菌也生成这样的菌落(见表 1)。

2.3 食物样品检验结果

从 30 份食物样品增菌后接种的 120 个平板上,用 MUCAP 试剂共测试 331 个可疑菌落。呈阳性反应的 49 个菌落,经生化和血清学试验确定为沙门氏菌的共 48 个,符合率 97.9%。错判为沙门氏菌的一个菌落出现在 SS 平板,经鉴定为粘质沙雷氏菌。282 个

表 1 沙门氏菌和相关菌的酯酶和生化反应

Table 1 Esterase and biochemical reactions of Salmonella and it's related microbes

菌株 Strains	株数 No.	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	H ₂ S	氧化酶 Oxidase	酯酶 Esterase (MUCAP)	脂肪酶(油) Lipase (Veg. oil)
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>							
亚属 I subgenus	49	-	-	+/-	-	+	-
亚属 II subgenus	8	-	-	+	-	+	-
亚属 III subgenus	4	(+)	-	+	-	+	-
亚属 IV subgenus	2	-	-	+	-	+	-
亚属 V subgenus	2	-	-	+	-	+	-
弗劳地氏枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	15	+/-	-/+	+	-	-	-
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	16	+	+	-	-	-	-
阴沟杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	16	+	+	-	-	-	-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	17	+	+/-	-	-	-	-
蜂房哈夫尼亚菌 <i>Hafnia alvei</i>	1	-	-	-	-	-	-
产酸克雷伯氏菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	3	+	+	-	-	-	-
肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	+	+	-	-	-	-
摩根氏菌 <i>Morganella morganii</i>	1	-	-	-	-	-	-
雷极普罗非登斯菌 <i>Providencia rettgeri</i>	1	-	-	-	-	-	-
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2	-	+	-	-	-	-
奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	30	-	-	+	-	-	+
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	4	-	+	+	-	-	+
粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	3	-	+	-	-	+	+
嗜水气单胞菌 <i>Aeromona hydrophilia</i>	5	(+)	+	-	+	+	+
类志贺邻单胞菌 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	6	+/-	-	-	+	+	+
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-	-	-	+	+	+

注: + 阳性反应; - 阴性反应; (+) 迟缓发酵。

Note: + positive; - negative; (+) delayed fermentation.

MUCAP 试验阴性的菌落,经生化试验为沙门氏菌的一个,其余均为非沙门氏菌,符合率 99.6%。(见表 2)。

表 2 MUCAP 试剂测试食品中沙门氏菌结果

Table 2 Result of testing for *Salmonella* in foods with MUCAP reagent

样 品 Samples	测试菌落 No.of colonies tested	MUCAP 试验 MUCAP test			
		阳 性 Positive		阴 性 Negative	
		判定数 No.of judged	符合数 No.of coin.	判定数 No.of judged	符合数 No.of coin.
猪 肉 Pork	121	21	21	100	100
鸡 肉 Chicken	110	23	23	87	86
蔬 菜 Vegetable	100	5	4	95	95
合 计 Total	331	49	48	282	281

3 讨论

关于沙门氏菌酯酶的研究报告见到的不多。从已发表的论文^[1~9]看,他们的结论与本试验的结果基本一致,即分泌辛酯酶是沙门氏菌属细菌共有的生理特性,而这一性能在肠杆菌科的各属中,除沙雷氏菌属外,多不具备,因此可作为沙门氏菌属的特征之一,在分类和鉴定上加以考虑。

快速检测沙门氏菌的方法已有很多,这些方法针对不同的目的和要求各有所长。本方法的特点是敏感性高,出现漏检的可能性很小,而且简便易行。当然从时间上看,它比在增菌后直接进行鉴定的快速法多分离培养一个步骤,但本法可以直接拿到纯培养物,直接做进一步核查或鉴定。尤其是当用于不需要增菌而直接分离培养的临床检验时,本法快速简便的优点就会更充分的显示出来。

用 MUCAP 检测沙门氏菌遇到的主要问题是与沙雷氏菌的交叉反应。为解决这一问题,我们根据沙雷氏菌分解蔗糖这一特点,在选择性分离培养基内补加 1%蔗糖。试验结果表明,这一办法是可行的,它并不影响沙门氏菌的生长和菌落特征,而能有效的把沙门氏菌与沙雷氏菌区分开。此外,肠杆菌科新增菌属(*Cedecea* 属)的大部分种也产生脂肪酶,它是否也水解辛酯及其衍生物,尚未试验。但即便水解,因其发酵蔗糖,也可用上述方法排除其干扰。

应用以玉米油等油或脂为酶底物测定细菌产脂肪酶的方法,揭示了不少细菌的产酶

特性。但本试验的结果表明,沙门氏菌产生的中短链(8 碳)酯酶不能用这一方法测知。除沙门氏菌外,是否还有其他细菌的产酯酶特性因检测方法问题而未被发现,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Abdalla S, Vila J, De Anta M T J. *British J Biomed Sci*, 1994, **51** (1): 5~8.
- [2] Aguirre P M, Cacho J B, Folgueira L *et al*. *J Clin Microbiol*, 1990, **28** (1): 148~149.
- [3] Freydiere A, Gille Y. *J Clin Microbiol*, 1991, **29** (10): 2357~2359.
- [4] Humbert F, Salvat G, Colin P *et al*. *Int J Food Microbiol*, 1989, **8** (1): 79~83.
- [5] Manafi M, Sommer R. *Lett Appl Microbiol*, 1992, **14** (4): 163~166.
- [6] Manafi M, Birgit W. *Lett Appl Microbiol*, 1994, **19** (5): 328~331.
- [7] Muno B, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M *et al*. *Am J Clin Pathol*, 1993, **100** (4): 404~406.
- [8] Olsson M, Syk A, Wollin R. *J Clin Microbiol*, 1991, **29** (11): 2631~2632.
- [9] Ruiz J, Sempere M A, Varela M C *et al*. *J Clin Microbiol*, 1992, **30** (2): 525~526.

RAPID DETECTION OF *SALMONELLA* WITH MUCAP REAGENT

Zhen Hongtai Yang Shuxian Liu Zhongxue Su Qing Zhou Yunxia

(Neimonggol Import and Export Commodity Inspection Bureau, Zhuowuda Road, Huhhot 010010)

Abstract The 4-methylumbelliferyl-octanoate (MUCAP) was applied for the identification of *Salmonella*, its specification, sensitivity, and availability were reported. 65 strains of standard *Salmonella*, 48 strains of *Salmonella* isolated from foods growing on plates of HE, DHL, SS and MaConkey agar have been tested with MUCAP. All of them were identified as MUCAP positive; whereas, among the non-*Salmonella* tested only *Pseudomonas* spp., *Aeromonas hydrophilia* and *Plesiomonas shigelloides* were shown as positive, but they could be differentiated easily with *Salmonella* by means of oxidase test. The unspecific reaction of *Serratia marcescens* could be eliminated by using the plate medium which has been added of 1% sucrose. Both the sensitivity and specificity of the method were up to 97% more, and the operating of the method was very facility and to be done within few minutes.

Key words 4-Methylumbelliferyl-caprylate (MUCAP), Caprylate esterase, *Salmonella*