

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.01.03

实验动物粪便中金黄色葡萄球菌和沙门菌检验方法的比较

王秀丽, 辛凌翔, 李 建, 张一帆, 李俊平, 张 媛*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-11-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 01-0016-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为探讨实验动物粪便中金黄色葡萄球菌和沙门菌的检测方法, 试验比较了国标的方法、ATB 生化鉴定试纸条、rRNA 测序分析对样品的检测结果, 发现生化鉴定试纸条和 16S rRNA 测序分析均可以准确、高效地检测出沙门菌和金黄色葡萄球菌, 而参考国标的方法, 有些金黄色葡萄球菌和沙门菌的鉴定结果与国标不一致。试验表明, 用 ATB 生化鉴定试纸条和 16S rRNA 序列分析检测沙门菌和金黄色葡萄球菌及其他菌的方法更可靠。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 沙门菌; 检验

Comparison of Detection Methods of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in Experimental Animals' Excrement

WANG Xiu-li, XIN Ling-xiang, LI Jian, ZHANG Yi-zhi, LI Jun-ping, ZHANG Yuan*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHANG Yuan, E-mail: zhangyuan@ivdc.org.cn

Abstract: National standard method, ATB biological identification card and 16S rRNA sequence analysis were compared in the test of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in experimental animals' excrement in order to study the detection methods. The comparison results showed that *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in excrement could be detected effectively and exactly in both of ATB biological identification method and 16S rRNA sequence analysis method. But according to the national standards, some of the *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* couldn't be detected, showing that ATB biological identification method and 16S rRNA sequence analysis method are reliable.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Salmonella*; detection

作者简介: 王秀丽, 硕士, 从事兽用生物制品检验及检测方法研究。

通讯作者: 张媛。E-mail: 8078@sina.com

金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌,可寄生于牛、猪、兔、鸡和人等。在实验动物中,家兔最为敏感,豚鼠、大鼠、小鼠也可感染发病^[1]。沙门菌为革兰氏阴性杆菌,可以引起多种动物的肠道感染,因此沙门菌病又称“副伤寒”或“肠道病”^[2]。金黄色葡萄球菌和沙门菌检验是实验动物粪便微生物检验、化妆品微生物检验、食品微生物检验中的重要检验参数,对实验动物和人类健康均具有十分重要的公共卫生学意义。两种菌的传统检验主要靠细菌的形态、培养特性、生化特性、血清学特性等,方法繁琐、耗时较长,且受检验人员能力和经验等因素的影响。随着分子生物学技术研究的深入和发展,PCR 指纹图谱、核酸杂交、16S rRNA 序列分析、脉冲场凝胶电泳等技术也逐渐在细菌鉴定中应用。本研究结合现代化的生化鉴定仪器及分子生物学方法,比较了不同方法鉴定结果的准确性,并制定了本实验室微生物鉴定程序。

1 材料与方 法

1.1 样品 含金黄色葡萄球菌和沙门菌的粪便盲样,编号为 0041、0065、0110、0179、0194,由中国食品药品检定研究院提供。

1.2 培养基及试剂 SS 琼脂平板、Baird - Parker 平板、马丁琼脂血平板、冻干兔血浆、革兰氏染色试剂盒均购自青岛海博生物技术有限公司;马丁肉汤、普通肉汤购自北京中海生物科技有限公司;裂解血细胞全血由中国兽医药品监察所细菌制品检测室制备;健康牛血清购自 gibco 公司;27F 和 1492R 引物合成及 PCR 产物测序由华大基因完成;PCR 2 × buffer mix 购自 TaKaRa;ATB ID32E 肠杆菌科和其他革兰氏阴性杆菌鉴定试纸条、Staph 葡萄球菌和微球菌鉴定试纸条购自生物梅里埃法国股份有限公司。

1.3 细菌分离纯化及形态检查 将粪便样品分别用生理盐水溶解后,用接种环挑取少量菌液划线接种含 0.4% 裂解血细胞全血和 10% 血清的马丁琼脂平板,37 °C 培养 24 h,观察是否纯粹生长,如果生长出形态不同的菌落,分别挑取单菌落划线接种

上述马丁琼脂平板,对纯化的菌落分别革兰氏染色,观察细菌形态,同时将溶解后的粪便样品接种含 10% 血清的马丁肉汤、普通肉汤,37 °C 培养 18 h,观察在液体培养基中的生长特性。

1.4 国标法 参考 GB/T14926.14 - 2001 金黄色葡萄球菌检测方法^[3],将样品接种于高盐甘露醇培养基,37 °C 培养 18 ~ 24 h,挑取 1 mm 左右、黄色且周边培养基由红变黄的菌落接种血琼脂平板,37 °C 培养 18 ~ 24 h,形成白色或者金黄色不透明、表面光滑、周围有 β 溶血环的菌落,且甘露醇发酵试验和血浆凝固酶试验阳性的,即可判定为金黄色葡萄球菌。参考 GB/T14926.1 - 2001 沙门菌检测法^[4],将样品接种于 SS 培养基,挑取可疑菌落接种 KI、H₂S、靛基质、尿素、赖氨酸脱羧培养基,37 °C 培养 18 ~ 24 h,再结合革兰氏染色及血凝试验综合判定。

1.5 生化试纸条鉴定法 按照 1.3 项的方法纯化出样品中含有的细菌并进行细菌形态检查,用 ATB ID32E 生化鉴定试纸条对革兰氏阴性杆菌进行生化鉴定,用 Staph 生化鉴定试纸条对革兰氏阳性菌进行生化鉴定。

1.6 16S rRNA 序列分析法 将按照 1.3 项纯化的菌落用细菌 16S rRNA 的通用引物 27F 和 1492R 扩增,PCR 反应程序为 98 °C 1 min,98 °C 10 s,56 °C 10 s,72 °C 2 min,30 个循环后 72 °C 10 min,将扩增片段测序,在 GenBank 中比对,确定细菌类别。

1.7 鉴别检验 根据金黄色葡萄球菌有耐高盐及在 BP 平板上的特殊的菌落形态,将样品接种于含 7.5% NaCl 的肉汤培养基,37 °C 170 r/min 振荡培养 24 h,同时将样品接种于 BP 琼脂平板,37 °C 培养 24 h,可以筛选金黄色葡萄球菌^[5]。

2 结果与分析

2.1 细菌分离纯化及形态检查 结果见表 1。经检定,编号为 0110 的样品和 0179 的样品中均有 2 种不同形态的细生长,编号为 0041、0065、0194 的样品均纯粹生长,均为一种细菌,0065 样品在加入 10% 血清的马丁肉汤生长后沉淀到试管底部,上层培养基澄清,在普通肉汤中均匀混浊生长。

表 1 样品中细菌分离纯化及细菌形态检查结果

Tab 1 Bacteria isolation, purification and characteristics test results

编号	纯粹检验	菌落形态	马丁肉汤	普通肉汤	革兰氏染色
0041	纯粹	薄膜状扩散,甚至厚薄交替呈层层波状的同心环样菌苔,45°折光观察有蓝色荧光。	均匀混浊生长	均匀混浊生长	G ⁻ 杆菌
0065	纯粹	光滑圆润灰白色菌落	上清澄清,底部有沉淀	均匀混浊生长	G ⁺ 球菌
0110	2 种菌落	0110-1 光滑圆润灰白色菌落 0110-2 光滑圆润半透明菌落	均匀混浊生长	均匀混浊生长	0110-1、0110-2 均为 G ⁺ 球菌
0179	2 种菌落	0179-1 薄膜状扩散,甚至厚薄交替呈层层波状的同心环样菌苔,45 度折光观察有蓝色荧光。	均匀混浊生长	均匀混浊生长	0179-1 G ⁻ 杆菌, 0179-2 G ⁺ 球菌
0194	纯粹	0179-2 光滑圆润灰白色菌落光滑圆润灰白色菌落,菌落大小比 0065 的大	均匀混浊生长	均匀混浊生长	G ⁺ 杆菌

2.2 生化鉴定 表 2 结果显示,0041、0065、0110-1、0110-2、0179-1、0179-2、0194 样品的鉴定结论均为好或极好,结果可信。

2.3 16S rRNA 序列分析 将分离纯化的细菌分别扩增 16S rRNA 序列,均扩增出大小约 1500 bp 的

条带,经测序比对,样品中含有的细菌类别见表 3。

2.4 国标法 金黄色葡萄球菌的检测根据国家标准方案鉴定结果见表 4。沙门菌的检测根据国标的方法所有的样品在 SS 培养基上生长均未长出无色半透明的菌落,因此未进行下去。

表 2 生化鉴定结果

Tab 2 Test results of biological detection

编号	试纸条	结果	判定
0041	ID32E	摩根菌	极好的鉴定结果
0065	Staph	金黄色葡萄球菌	好的鉴定结果
0110-1	Staph	金黄色葡萄球菌	好的鉴定结果
0110-2	Staph	木糖葡萄球菌	好的鉴定结果
0179-1	ID32E	摩根菌	极好的鉴定结果
0179-2	Staph	金黄色葡萄球菌	好的鉴定结果
0194	ID32E	猪霍乱沙门菌	极好的鉴定结果

表 3 16S rRNA 序列比对结果

Tab 3 16S rRNA sequence compare results

编号	比对结果
0041	摩根菌
0065	金黄色葡萄球菌
0110-1	金黄色葡萄球菌
0110-2	木糖葡萄球菌
0179-1	摩根菌
0179-2	金黄色葡萄球菌
0194	猪霍乱沙门菌

表 4 金黄色葡萄球菌的检测结果

Tab 4 Test results for *Staphylococcus aureus*

编号	高盐甘露醇培养基平板	鲜血琼脂平板	血浆凝固酶发酵试验	甘露醇发酵试验	金黄色葡萄球菌结果判定
0041	红色菌落	溶血	-	-	-
0065	黄色菌落	溶血	+	+	+
0110	灰白色和金黄色两种菌落,培养基均变黄	两种菌均溶血	-	+	-
0179	黄色菌落和红色菌落,黄色菌落培养基周边变黄,	两种菌均溶血	+	+	+
0194	未生长	不溶血	-	-	-

2.5 鉴别检验 5 份样品在 7.5% NaCl 肉汤培养基中 37 ℃ 170 r/min 培养 16 h 后无菌生长, 延长培养至 24 h, 菌液均匀混浊, 挑取菌液划线接种高盐甘露醇培养基, 0041 和 0110 样品生长出黄色圆形菌落, 0065、0194 和 0179 样品均生长出黄色水滴状的菌落, 经鉴定, 黄色水滴状菌落为地衣芽孢杆菌, 说明样品中的金黄色葡萄球菌在高盐肉汤培养基中不生长。将样品按照 1.3 项纯化后经革兰氏

染色阳性球菌接种 Baird - Parker 平板, 结果显示 0065 和 0110 样品中的灰白色菌落和 0179 样品中的革兰氏阳性球菌为圆形、光滑、凸起、湿润、灰色或黑色、周围有浑浊带, 在其外层有一透明带, 符合大部分金黄色葡萄球菌的特征。0110 样品中黄色菌落接种 Baird - Parker 培养基后菌落形态为黑色光滑菌落, 周边无不透明圈, 结果见表 5。

表 5 鉴别检验结果

Tab 5 Distinguish test results

编号	高盐肉汤	高盐甘露醇平板	Baird - Parker 平板
0041		黄色圆形菌落	/
0065		黄色水滴状菌落	圆形、光滑、凸起、湿润、黑色、周围有浑浊带, 在其外层有一透明带
0110 - 1		黄色圆形菌落	圆形、光滑、凸起、湿润、黑色、周围有浑浊带, 在其外层有一透明带
0110 - 2	8 h 内未生长, 24 h 后均匀浑浊生长		圆形、光滑、凸起、湿润、黑色、周围无浑浊带, 无透明带
0179 - 1		黄色水滴状菌落	/
0179 - 2			圆形、光滑、凸起、湿润、黑色、周围有浑浊带, 在其外层有一透明带
0194		黄色水滴状菌落	/

3.6 检验结果报告 根据国家标准检测, 用生化检定试纸条检测和 16S rRNA 序列分析法检测样品中金黄色葡萄球菌和沙门菌的结果见表 6。国家标

准的方法无法将 0194 样品中的沙门菌检测出, 也无法将 0110 样品中的金黄色葡萄球菌检测出。

表 6 3 种检测方法检验结果比较

Tab 6 Test results compare of 3 different detection methods

编号	国家标准		生化鉴定		16S rRNA	
	沙门菌	金黄色葡萄球菌	沙门菌	金黄色葡萄球菌	沙门菌	金黄色葡萄球菌
0041	-	-	-	-	-	-
0065	-	+	-	+	-	+
0110	-	-	-	+	-	+
0179	-	+	-	+	-	+
0194	-	-	+	-	+	-

3 讨论与结论

中国食品药品检定研究院组织的能力验证项目——实验动物粪便中金黄色葡萄球菌和沙门菌

的检验, 不限定方法, 提供的作业指导书为实验动物粪便中微生物检测国家标准(2001 年)。本检验参考国家标准存在以下问题: 沙门菌和在 SS 培养

基生长的形态为粉红色菌落,与国家标准描述的无色半透明菌落不一致;0110 样品中的金黄色葡萄球菌不凝固兔血浆。根据国家标准判定不能准确检出样品中的细菌。文献报道的可用于金黄色葡萄球菌鉴别检验的培养特性,如耐高盐、血浆凝固酶阳性或在 Baird - Parker 平板上生长特性,是大部分而不是全部金黄色葡萄球菌具有的特性,不含血浆凝固酶的金黄色葡萄球菌血浆凝固酶试验阴性,不分解脂肪的金黄色葡萄球菌在 Baird - Parker 平板上的生长形态为圆形、光滑、凸起、湿润、黑色、周围有浑浊带,在其外层有一透明带^[1,5]。

随着科学技术的不断发展,新的微生物鉴定技术也不断出现,尤其分子生物学的方法的不断发展,其快速、准确的优势不断得到认可,如化妆品入境检疫的行业标准中已应用 PCR 方法^[6]。另外生化鉴定结合仪器及数据库的应用,也能为细菌的鉴定提供科学有效的方法^[7]。本研究的数据可以为化妆品中微生物检验、食品中微生物和实验动物清洁度控制的国家标准和行业标准的修订提供参考数据。

供样单位制备样品的粪便为 SPF 大鼠的粪便,粪便未经灭菌处理,在粪便中添加沙门菌、金黄色葡萄球菌、木糖葡萄球菌及摩根菌等制备而成。样品 0110 中未添加金黄色葡萄球菌,而本实验室检出的金黄色葡萄球菌可能为大鼠粪便中本身携带的金黄色葡萄球菌,因此其细菌特性与添加的金黄色葡萄球菌的特性不一致,本结果与供样单位对留存样品再测结果一致。

本试验总结出的检验方法如下:首先将样品溶解后接种营养成分比较丰富的马丁琼脂平板(含 0.1% 裂解血和 10% 健康动物血清),将样品中含有的菌尽量全部培养起来,观察菌落形态,判定样品中的细菌是否纯粹,如果有一种以上不同形态的菌,分别挑取不同形态的菌划线接种平板,纯化培养后对细菌分别进行鉴定。先对纯化的细菌进行革兰氏染色,观察细菌形态,如果为革兰氏阴性杆菌则用 ATB ID32E 试纸条进行生化鉴定,如果为革兰氏阳性球菌,则选择 Staph 试纸条进行生化鉴定,

或者对纯化出的菌用 27F 和 1492R 引物对扩增细菌的 16S rRNA,扩增出的序列与 GenBank 中的序列比对,即可得知细菌的属种。该检验方法较简单快速准确可行。

参考文献:

- [1] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Veterinary Microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013.
- [2] 焦新安. 沙门菌病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Jiao X A. Salmonellosis [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.
- [3] 中华人民共和国国家标准质量监督检验检疫总局. GB/T 14926. 14 - 2001 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法[S].
General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the People's Republic of China. GB/T 14926. 14 - 2001 Detection method for *Staphylococcus aureus* in experimental animals[S].
- [4] 中华人民共和国国家标准质量监督检验检疫总局. GB/T 14926. 1 - 2001 实验动物 沙门菌检测方法[S].
General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the People's Republic of China. GB/T 14926. 1 - 2001 Detection method for *Salmonella* in experimental animals[S].
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 7918. 5 - 87 化妆品微生物标准检验方法 - 金黄色葡萄球菌[S].
Ministry of health of the People's Republic of China. GB/T 7918. 5 - 87 Microorganism standard detection methods for cosmetics—*Staphylococcus aureus* [S].
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T2206. 10 - 2014 化妆品微生物检查方法 - 金黄色葡萄球菌 PCR 法[S].
General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the People's Republic of China. SN/T2206. 10 - 2014 Microorganism detection methods for cosmetics—PCR to detect *Staphylococcus aureus* [S].
- [7] 陶明, 王媛, 郭琪, 等. 5 种检测化妆品中检测金黄色葡萄球菌方法的比较[J]. 广东药科大学学报, 2019(5): 1 - 5.
Tao M, Wang Y, Guo Q, et al. Compare of 5 methods to detect *Staphylococcus aureus* in cosmetics [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2019(5): 1 - 5.