

三种金黄色葡萄球菌显色培养基检测效果的比较

黄汝添^{1,2} 吴清平^{1*} 张菊梅¹ 郭伟鹏¹ 吴许文¹

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(2. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510070)

摘要: 本文研究 2 种国外主流的金葡萄菌显色培养基和广东环凯微生物科技有限公司生产的 PEN-TCF 检测金葡萄菌的效果。通过研究 3 种产品对多种金葡萄菌菌株的回收率、最低检出限以及检测人工污染食品的回收率、特异性和抗干扰能力比较其检测效果。结果表明 3 种培养基的最低检出限相近, 显色培养基 A 和 PEN-TCF 的回收率较高, 但抗干扰能力较低; 显色培养基 B 回收率稍低, 而抗干扰能力较强; PEN-TCF 和培养基 B 的特异性更优于培养基 A。

关键词: 金黄色葡萄球菌, 显色培养基, 检测比对

Comparison of the Detection Effect of Three Chromogenic Media of *Staphylococcus aureus*

HUANG Ru-Tian^{1,2} WU Qing-Ping^{1*} ZHANG Ju-Mei¹ GUO Wei-Peng¹ WU Xu-Wen¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Corporation, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: Two current main chromogenic media products of abroad and the newly developed PEN-TCF from Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Corporation were compared in this study. Their recovery of different *Staphylococcus aureus* strains, minimum detection limits and the recovery, specificity and anti-disturbance of detecting artificial contaminated samples were studied. The results showed that 3 media had similar minimum detection limits, Chromogenic Media A and PEN-TCF had better sensitivity but worse anti-disturbance, while Chromogenic Media B had better anti-disturbance yet lower sensitivity, and Media B and PEN-TCF were more specific than Media A.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Chromogenic media, Detection comparison

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 下简称金葡萄菌)传统的检测方法(国标法)费时费力, 总成本也较高, 当检测杂菌较多的样品时此缺点更为突出, 而且挑取可疑菌落的步骤存在不可避免的假阴性风险。

显色培养基是新型的检测手段, 它在选择培养基中加入检测目标菌的特征性酶的显色底物, 当目标菌在培养基上生长时, 其特征性酶就能降解显色底物并产生带有特殊颜色的代谢物, 使菌落形成特定的颜色或形态。而干扰菌被抑制或不产生特征性

酶而不显色,因而能被区别。所以显色培养基检测法能节省大量人力、财力和时间,也大大减少假阴性的机会,而且还能对目标菌行定量检测^[1]。金葡菌显色培养基法与传统的检测方法相比具有明显的优势。国外多家知名的培养基公司都致力于金葡菌显色培养基的研发。

从已有的国内外文献来看,迄今为止对显色培养基检测效果的研究主要集中在临床样品的方面,对食品检测效果的研究依然比较缺乏。因此本研究对现有主流产品显色培养基 A、显色培养基 B 和环凯公司新开发的 PEN-TCF 对多种金葡菌株的检出回收率以及对人工污染食品中金葡菌的检测效果进行比对,并主要从最低检出限、回收率、抗干扰能力和特异性等指标对以上 3 种显色培养基进行比较。

1 实验材料

1.1 菌株

本研究所使用的金葡菌 ATCC6538 和 CMCC26003 标准菌株由广东环凯微生物科技有限公司提供,金葡菌野生分离株 A、B、D、I、K、W 采用传统的国标法^[2]从多种食品中分离获得,溶血试验均为阳性,血浆凝固酶阳性;并用 PCR 扩增其凝固酶基因、热稳定 DNA 酶基因和金葡菌特异片断 *Sma* I 的方法确认其均为金葡菌^[3]。

1.2 主要试剂

1.2.1 显色培养基 A: 由法国公司开发,金葡菌菌落呈紫红色(Mauve),杂菌被抑制或形成白色、浅蓝或深蓝色菌落,总检测时间为 20 h~24 h。

1.2.2 显色培养基 B: 由美国公司开发,不需要灭菌或准备平板,直接将 1 mL 检样液加入其产品的测试片中间再压片使检样液均匀分布及凝固,后即可进行培养,培养后金葡菌形成紫色菌落,杂菌为黑色或蓝色。培养后一般需经 62°C 热处理,后再用 SED 显色片检验金葡菌的热稳定 DNA 酶(以下简称“TNase”)。金葡菌落能降解 SED 上的长链 DNA 形成粉红色显色圈,因而能被鉴别。其总检验时间为 24 h~27 h。

1.2.3 PEN-TCF: 由广东环凯公司开发,金葡菌菌落的在 PEN 培养基上能产生卵黄降解透明圈,培养后需热处理并以 TCF 显色片检测 TNase,其原理与 1.2.2 SED 相似, PEN-TCF 总检验时间为 20 h~24 h。

使用到的食品购自超市,其他试验材料购于广东环凯微生物科技有限公司,或由其提供。

2 实验方法

2.1 对多种金葡菌菌株的回收率试验

把金葡菌株 ATCC6538、CMCC26003、A、B、D、I、K、W 的新鲜培养液以生理盐水分别稀释至浓度约为 10^3 CFU/mL 的菌液,用 0.2 mL 菌液分别涂布营养琼脂(下简称为“NA”)、显色培养基 A、和 PEN;吸取 1 mL 菌液加入 4 mL 生理盐水中,混匀后吸取 1 mL 加入显色培养基 B,再压片。上述试验均做 2 个平行,37°C 培养 24 h 后观察结果,计数各种培养基上生长的总菌落数,计算回收率。

2.2 三种培养基最小检出比

用生理盐水稀释 ATCC 6538 金葡菌菌液到不同浓度,按照 2.1 方法对三种显色培养基最小检出量比对试验。

2.3 人工污染食品的检测

2.3.1 制备菌液: 分别挑取金葡菌株 ATCC6538 和 CMCC26003 的新鲜菌苔制成菌悬液,以生理盐水稀释至 7.5×10^4 CFU/mL,等量混合后作为污染菌液。

2.3.2 样品处理: 用巧克力蛋糕、5 种冷冻饺子、多种凉拌菜、豆腐和油炸豆腐作为检测样品,购回后马上以无菌的手段切碎成约 0.2 cm³ 的碎片。以 2 mL 菌液污染 25 g 样品并搅拌混匀,室温(约 18°C)放置 10 min,备用。

2.3.3 检样: 用 225 mL 无菌生理盐水中对 2.3.2 样品进行检样,按照 2.1 方法检测检样液,各做 2 个平行试验,37°C 培养 24 h 后观察结果,计数 NA 平板上的总菌数、显色培养基上生长的显色阳性菌落数和不显色的杂菌菌落数。

2.3.4 金葡菌阳性对照: 吸取 2 mL 2.3.1 菌液加入 248 mL 生理盐水中混匀,吸取 0.2 mL 涂布 NA,做 2 个平行试验,37°C 培养 24 h,计菌落数作为阳性对照。

2.3.5 确认试验: 随机挑取每个显色培养基上的 20 个阳性菌落进行革兰氏染色和镜检,若不是 G⁺ 球菌则判断为假阳性;若是,则转接肉汤培养后进行血浆凝固酶试验,若为阴性,则判断为假阳性;若为阳性,则判断为金葡菌。将分离到的假阳性菌用法国生物梅里埃 API 生化鉴定产品进行鉴定。

3 实验结果

3.1 对金葡菌纯菌的检出回收率比对

回收率=(显色培养基菌落数/NA 上菌落数)×100%, 若数值大于 100% 计为 100%。从表 1 可看出, PEN-TCF 对多种金葡萄菌株平均回收率最高。

3.2 三种培养基最低检出限比对结果

如表 2 所示, 3 种培养基的最低检出限均为 8.3 CFU/mL(检测 0.2 mL 菌液)。

3.3 人工污染食品的检测回收率比对

根据 2.3.4 阳性对照结果, NA 平均生长 139 个菌落, 则理论上 2.3.3 每个显色培养基最多检出 139 个阳性金葡萄菌落。以此计算 3 种显色培养基的回收率:

回收率=(显色培养基中阳性菌落数/139)×100%, 若阳性菌落数大于 139, 也按照 100% 计算。从表 3

可看出, 显色培养基 A 回收率最高。

3.4 检测人工污染食品的抗干扰能力比对

根据 2.3.3 NA 上的总菌数和显色培养基上(不显色的)杂菌菌落数计算抗干扰能力。

NA 杂菌菌落数=NA 总菌落数-金葡萄菌落数(=139, 见 3.3);

抗干扰率=(1-显色培养基杂菌菌落数/NA 杂菌菌落数)×100%。从表 4 可看出, 显色培养基 B 的抗干扰能力最强。

3.5 检测人工污染食品的特异性比对

如表 5 所示, 显色培养基 B 和 PEN-TCF 均没有发现假阳性; 显色培养基 A 上部分紫红色的阳性菌落在 2.3.5 确认试验中判别为假阳性, 从凉拌菜和豆腐样品中分离的假阳性菌落经鉴定分别为腐生葡萄球菌和棒状杆菌属, 可见显色培养基 A 的特异性较低。

表 1 对金葡萄纯菌的回收率试验结果
Table 1 Recovery of different *Staphylococcus aureus* strains

培养基 Media	Standard strain ATCC 6538	Standard strain CMCC 26003	Wild strain A	Wild strain B	Wild strain D	Wild strain I	Wild strain K	Wild strain W	各种培养基的 平均回收率 Average recovery of 4 media (%)
PEN-TCF	154 (100)	113 (100)	153 (92.7)	112 (91.8)	146 (79.8)	215 (100)	147 (79.9)	115 (95.0)	92.4
显色培养基 A Chromogenic media A	160 (100)	101 (89.4)	171 (100)	66 (54.1)	126 (68.9)	94 (49.0)	106 (57.6)	98 (81.0)	75.0
显色培养基 B Chromogenic media B	115 (97.5)	45 (39.8)	123 (74.5)	110 (90.2)	108 (59.0)	212 (100)	136 (73.9)	57 (47.1)	72.8
NA	118	113	165	122	183	192	184	121	100

注: 表 1 中的数据为各种金葡萄菌株在不同的培养基上生长的菌落数平均值(CFU/皿), 括号中为其回收率(%)。

Note: Data in the table 1 are colony amounts of different *Staphylococcus aureus* on 4 media (CFU/plate), and the data in bracket below show their recovery (%).

表 2 显色培养基最低检出限
Table 2 Minimum detection limit of chromogenic media

金葡萄菌液浓度 Concentration of <i>Staphylococcus aureus</i> solution (CFU/mL)	8.3×10^3	8.3×10^2	8.3×10^1	8.3	8.3×10^{-1}	8.3×10^{-2}
PEN-TCF	+	+	+	+	-	-
显色培养基 A Chromogenic media A	+	+	+	+	-	-
显色培养基 B Chromogenic media B	+	+	+	+	-	-

注: 表中“+”表示检出金葡萄, “-”表示未检出。

Note: “+”shows *Staphylococcus aureus* being detected, while “-”shows not.

表3 显色培养基检测人工污染食品的回收率
Table 3 Recovery of chromogenic media detecting artificially contaminated food

培养基 Media	巧克力蛋糕 Chocolate cake	饺子 Dumpling	凉拌菜 Acetarious	豆腐 Bean curd	油豆腐 Fried bean curd	平均回收率 Average recovery (%)
PEN-TCF	130	95	90	102	96	73.4
显色培养基 A Chromogenic media A	128	132	140	107	102	87.7
显色培养基 B Chromogenic media B	84	73	80	80	76	56.5

注: 表3中为3种培养基检出的阳性菌落数平均值(CFU/皿), 阳性对照=139CFU/皿。

Note: Data in the table 3 are average positive colony amounts on 3 media (CFU/plate), positive control is 139 CFU/plate.

表4 显色培养基检测人工污染食品抗干扰率
Table 4 Anti-disturbance rate of chromogenic media detecting artificially contaminated food

培养基 Media	巧克力蛋糕 Chocolate cake	饺子 Dumpling	凉拌菜 Acetarious	豆腐 Bean curd	油豆腐 Fried bean curd	平均抗干扰率 Average anti-disturb rate (%)
PEN-TCF	3	1605	1710	620	51	57.1
显色培养基 A Chromogenic media A	3	862	1361	11	2298	53.7
显色培养基 B Chromogenic media B	1	43	176	22	35	93.4
NA	4	2411	5461	1561	2411	0

注: 表4中为4种培养基检出的杂菌菌落数平均值(CFU/皿)。

Note: Data in the table 4 are average negative colony amounts on 4 media (CFU/plate).

表5 显色培养基检测人工污染食品的特异性比较
Table 5 Specificity of chromogenic media detecting artificially contaminated food

培养基 Media	巧克力蛋糕 Chocolate cake	饺子 Dumpling	凉拌菜 Acetarious	豆腐 Bean curd	油豆腐 Fried bean curd
PEN-TCF	0	0	0	0	0
显色培养基 A Chromogenic media A	0	0	2	0	3
显色培养基 B Chromogenic media B	0	0	0	0	0

注: 表5中列出确认试验中分离到的假阳性菌落数。

Note: Data in the table 5 are the false negative colony amounts found in the confirmation test.

4 讨论

4.1 显色培养基检测多种金葡菌的回收率和最低检出限

3种显色培养基对某种金葡菌菌株的回收率差异较大(如CMCC26003和I),可能是由于各显色培养基采用不同的选择性物质,而不同金葡菌菌株对其耐受性差异较大所致。由此原因产生的低回收率虽然可通过延长培养时间来解决,但总检验时间延长,杂菌和假阳性菌落出现几率亦会增加^[4]。3种显

色培养基中PEN对多种金葡菌菌株的平均回收率最高。3种培养基的最低检出限均在同一个数量级。

4.2 显色培养基检测人工污染食品效果

在检测人工污染食品的比对中,显色培养基A对金葡菌的回收率最好,PEN次之,显色培养基B较差。John报道杂菌落会影响金葡菌的生长和显色^[5],但在本研究中杂菌对培养基A上的金葡菌的显色基本没有影响,其回收率最高。而PEN受到杂菌影响较大,杂菌多则回收率稍低,杂菌少则回收率较

好。显色培养基B对各种样品中的金葡菌的回收率都比较相近,表明它抗干扰能力较强,受杂菌和样品成分的干扰较少,但其总体回收率稍低。

显色培养基B和PEN-TCF特异性较好,因为其都检测TNase,已知此酶只有极少数的细菌(如中间葡萄球菌和猪葡萄球菌)能产生,其对金葡菌的特异性与血浆凝固酶相近,以至TNase的检测被视为鉴定金葡菌的重要依据^[6]。而显色培养基A显色底物所针对的酶特异性稍低,John^[5]和本研究都发现部分棒状杆菌、微球菌亦能在其上形成假阳性菌落。假阳性的棒状杆菌菌落形态与金葡菌的稍有不同,但缺乏经验的检验员较难区别。

根据本研究的结果,3种显色培养基各有特点和优劣,环凯微公司的PEN-TCF已达到国外同类产品的水平,某些指标上更优于国外的产品。而培养基A国内市价为1100元/L(每平板约为15元),培养基B的为533元/25块测试片+280元/20片SED(检测每个样约为35元),PEN-TCF检测一个样约为8元,大大低于国外产品的价格。

显色培养基在检测食品样品会遇到更多的挑战,不仅干扰菌的种类更多更复杂,而且食品的成分和多种添加剂更可能改变显色培养基的特性。因此显

色培养基针对食品检测效果的研究和改进还需要进一步加强。

参 考 文 献

- [1] Silva BO, Caraviello DZ, Rodrigues AC, *et al.* Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *Journal of Dairy Science*, 2005, **88**(8): 3000–3008.
- [2] 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验(GB/T4789.10-2003), 中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验.
- [3] 姜延龙, 张宇, 田波, 等. PCR技术检测金黄色葡萄球菌进展. *食品科学*, 2006, **27**(5): 265–269.
- [4] Olivier G, Muriel W, Nicolas F, *et al.* Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**(4): 1587–1591.
- [5] John DP, Claire R, Lynne A, *et al.* Evaluation of S. aureus ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41**(12): 5695–5698.
- [6] 出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法(SN 0172-92), 中华人民共和国进出口商品检验行业标准.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定,计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体),不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下,希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(\text{h})$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格 (和%除外), 例如: $20\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$, 不能写成 $20 \times 0.3\text{ cm}$; $3 \sim 5$ 不可写成 $3\sim 5$; $3\% \sim 6\%$ 不可写成 $3\sim 6\%$ 等。