

气相色谱法分析沙门氏菌脂肪酸组成的研究

宋红梅¹, 李波¹, 李丽婕¹, 曹春红¹, 田润², 张雅薇²

摘要: [目的] 获得沙门氏菌特征脂肪酸组成本底资料, 评价脂肪酸分析方法在沙门氏菌属及型水平的判断能力。[方法] 选取不同年代、不同血清型的沙门氏菌分离株 117 株, 提取脂肪酸, 应用 Sherlock MIS 系统进行菌体脂肪酸组成及含量的分析。[结果] 所有菌株共有的脂肪酸成分有 12 种, 通过结合菌落特征, 沙门氏菌属水平的判断符合率达到 92.3%。[结论] MIDI 菌库中沙门氏菌脂肪酸数据不完善, 可通过与传统形态、生化反应结合方式实现快速鉴定。本试验同时提供了我国沙门氏菌脂肪酸组成基础数据。

关键词: 沙门氏菌; 气相色谱; 脂肪酸

STUDY ON THE CELLULAR FATTY ACIDS COMPOSITION OF SALMONELLA BY UN-QUALIFICATION RATES ANALYSIS SONG Hong-mei, LI Bo, LI Li-jie, et al. (Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: [Objective] To collect CFAs (cellular fatty acids) background data of Salmonella in China, and to evaluate the application value of fatty acid methyl ester (FAME) method in Salmonella strain identification. [Methods] 117 Salmonella strains belonging to 8 serotypes were isolated from 2005 to 2007 in China, and selected and fatty acid methyl ester were extracted. Sherlock Microbial identification system was used to analyze the data. [Results] Twelve fatty acids were the common components contained in all of the tested strains. Combining with the colonial morphology, the coincidence of generic judgment was 92.3%. [Conclusion] FAME method is useful in rapid identification of Salmonella strains. But the CFAs information of Salmonella in Sherlock standard library is deficient. A CFAs database for Chinese isolates of Salmonella has been developed.

Key words: Salmonella; Gas chromatography; Fatty acid

在世界各地的食物中毒中, 沙门氏菌引起的中毒病例占首位或第 2 位。我国食品污染物监测网的数据也显示, 沙门氏菌污染食品 (尤其是肉类) 近年来在以较快的速度增长。

沙门氏菌传统分类鉴定方法是根据细菌的培养特性, 生化反应、抗原特征等进行的。依据菌体 O 抗原和鞭毛抗原的不同可鉴别出血清型 2 000 多种, 在我国已发现 26 个菌群, 252 个血清型。10 种是主要血清型, 主要隶属于 A~E 群, 其中以鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌及猪霍乱沙门氏菌为最常见。菌株属内变异会导致其生化结果、表性特征的改变如鞭毛抗原的缺失、血清交叉凝集等, 往往使得分类结果出现错误, 或无法鉴定。

自 1963 年 Abel 率先将气相色谱 (GC) 应用于肠杆菌的菌体脂肪酸成分分析以来, 随着分析仪器和分析软件的逐渐成熟, 菌体脂肪酸分析已成为微生物化学分类方法的重要组成部分^[1]。不同微生物体细胞膜中磷脂脂肪酸的含量和结构具有种属特征或与其分类位置密切相关, 能够标志某一类或某种特定微生物的存在^[2]。脂肪酸分析方法将甲基脂肪酸提取与灵敏的气相色谱法相结合, 是一种适用于细菌的快速、稳定鉴定方法^[3]。脂肪酸分析相比于基因或 DNA 分型方法, 脂肪酸成分不受质粒损失或增加的影响, 且指示的是微生物“存活”的那部分群体, 试验结果更为客观、可靠^[4]。20 世纪 90 年代美国 MIDI 公

司开发成功了基于细胞 C9~C20 脂肪酸分析的微生物鉴定自动化系统 Sherlock MIS。该系统有一套完整的标准化程序, 较好地解决了分析过程的条件选择和质量控制问题。获得的数据可应用 Sherlock MIS 系统附带的软件进行菌株聚类及脂肪酸成分主成分分析, 大大提高了脂肪酸分析方法的准确性和重复性。且操作简便, 分析周期短, 相比传统方法至少可提前 24 h 获得菌株鉴定结果, 特别适用于高通量标本的分析。但由于软件内置数据库的不完善, 使其在细菌分类、鉴定上的应用受到限制。

MIDI 公司研发的沙门氏菌脂肪酸数据库中仅包含伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌及邦戈沙门氏菌 5 种血清型菌株的数据。本研究选择 2005~2007 年河北省 8 个血清型的沙门氏菌流行株, 应用 Sherlock MIS 系统进行脂肪酸分析, 评价 Sherlock 系统对沙门氏菌快速鉴定的意义, 补充和完善 MIDI 数据库中沙门氏菌脂肪酸数据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2005~2007 年河北省 7 个城市的沙门氏菌阳性分离株 117 株, 共 8 个血清型, 其中德尔卑沙门氏菌 23 株、阿贡纳沙门氏菌 20 株、山夫登堡沙门氏菌 24 株、猪霍乱沙门氏菌 14 株、鸭沙门氏菌 15 株、伊鲁木沙门氏菌 8 株、明斯特沙门氏菌 7 株、肠炎沙门氏菌 6 株。所有菌株均经 API20E 和沙门氏菌属诊断血清分型验证。

1.2 主要仪器和试剂

Agilent6850 气相色谱仪、Sherlock MIS 系统、特氟隆螺帽

作者简介: 宋红梅 (1972-), 女, 本科, 副主任检验技师, 研究方向: 微生物检验

作者单位: 1. 石家庄市疾病预防控制中心, 石家庄, 050016; 2. 石家庄市卫生监督局

培养管 (美国 Fisher 公司)、电子分析天平、恒温水浴箱

MIDI 标准品、TSBA 培养基 (美国 BD 公司)

脂肪酸提取溶液 : NaOH 45 g, 甲醇 150 ml, 纯水 150 ml; 溶液 : 6.0 mol/L HCl 325 ml, 甲醇 275 ml; 溶液 : 正己烷 200 ml, 甲基叔丁基醚 200 ml; 溶液 : NaOH 10.8 g, 纯水 900 ml。

1.3 脂肪酸提取

按照 MIDI 公司的微生物识别系统操作手册, 挑取 HE 培养基上新鲜培养的待测菌株单克隆按 4 区划线接种至 TSBA 培养基, 28℃ 培养 24 h。用一次性接种环刮取 40 mg 菌体, 置于 8 ml 培养管底部, 加入 1 ml 溶液 I, 100℃ 水浴 30 min, 迅速冷却后加入 2 ml 溶液 , 混匀后 80℃ 水浴作用 10 min, 迅速冷却, 加入 1.25 ml 溶液 , 上下颠倒震荡 10 min, 吸弃下层溶液。在上层溶液中加入 3 ml 溶液 , 上下颠倒震荡 5 min。待溶液分层后, 吸取上层液体于 GC 样品管中待测。

1.4 色谱分析条件

Agilent6850 气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器 (FID), 25 m Ultra-2 色谱柱, 二级程序升温: 起始温度 170℃, 每分钟升高 5℃ 至 260℃, 在以每分钟升高 40℃ 升至 310℃, 维持 1.5 min。进样口温度 250℃, 载气为氢气, 流速 0.4 ml/min, 柱压 9.00 psi 分流进样模式, 分流比 1:100, 进样量 2 μl。检测器温度 300℃, 氢气流速 30 ml/min, 空气流速 400 ml/min, 尾吹气 (氮气) 流速 30 ml/min。

1.5 数据分析

系统根据各脂肪酸组分保留时间计算等链长 (ECL) 值; 确定目标组分的存在, 采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量, 再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度 (SI), 从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果, 但当报告的几个菌种的 SI 比较接近时, 则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断^[5]。

2 结果

2.1 沙门氏菌脂肪酸成分

在检测的所有沙门氏菌中共得到 19 种不同脂肪酸成分 (见表 1)。其中所有菌株都含有的脂肪酸成分有 12 种, 分别为 12:0、14:0、14:02OH、16:0、17:0cyclo、17:0、18:1ω9c、18:0、19:0cycloω8c、SumInFeature2、SumInFeature3、SumInFeature8。占优势的脂肪酸成分为: 12:0 (3.30%)、14:0 (6.81%)、16:0 (27.22%)、17:0cyclo (9.20%)、SumInFeature2 (7.74%)、SumInFeature3 (12.68%)、SumInFeature8 (21.23%)。其余脂肪酸成分的含量介于 0.28%~1.52% 之间。其中猪霍乱、肠炎、德尔卑、伊鲁木、明斯特沙门氏菌各自拥有 14 种共有脂肪酸成分; 而山夫登堡、阿贡纳、鸭沙门氏菌则各自拥有 13 种共有脂肪酸成分。25% 山夫登堡沙门氏菌缺少 13:0 脂肪酸, 阿贡纳、鸭沙门氏菌则出现 16:1ω5c 缺失菌株。另外 30% 以上肠炎、山夫登堡沙门氏菌检出 SumInFeature1 成分。

表 1 沙门氏菌各脂肪酸成份的平均百分含量 (×10⁻²)

脂肪酸成份	平均百分含量							
	猪霍乱	肠炎	阿贡纳	德尔卑	山夫登堡	伊鲁木	鸭	明斯特
12:0iso	0.19 ¹⁾	ND	0.20 ¹⁾	ND	0.17 ¹⁾	ND	0.22	ND
12:0	3.32	3.23	3.16	3.22	3.36	3.42	3.35	3.30
13:0	0.17	0.16	0.17	0.19	0.14 ³⁾	0.15	0.18	0.16
14:0	6.67	6.75	6.95	6.87	6.82	6.90	6.57	6.82
SumInFeature1	ND	1.44 ¹⁾	0.38 ¹⁾	1.40 ¹⁾	1.23 ²⁾	1.60 ¹⁾	1.35	1.25 ¹⁾
14:02OH	0.85	0.90	0.87	0.82	0.92	0.87	0.70	0.90
SumInFeature2	7.85	7.60	8.13	7.82	7.25	7.75	7.57	7.80
SumInFeature3	13.15	12.00	10.93	12.00	15.20	16.00	17.20	15.20
16:1ω5c	0.19	0.13	0.15 ³⁾	0.15	0.17	0.16	0.17	0.14
16:0	28.00	28.20	28.30	28.35	26.50	26.50	27.00	27.50
17:1ω8c	0.48 ¹⁾	ND	0.53 ¹⁾	0.37 ²⁾	0.18 ¹⁾	0.18 ¹⁾	0.31	ND
17:0cyclo	7.77	12.70	11.85	10.50	8.30	8.30	7.50	8.75
17:0	0.50	0.57	0.70	0.72	0.51	0.51	0.65	0.44
18:1ω9c	0.80	0.85	0.95	0.97	0.58	0.58	0.67	1.07
SumInFeature8	21.50	21.00	20.21	20.00	22.70	22.70	22.00	22.40
18:0	2.30	1.75	2.00	2.75	1.10	1.10	2.35	1.32
19:0cycloω8c	1.67	2.20	2.30	2.15	1.10	1.10	0.82	1.02
19:0anteiso	0.36 ¹⁾	ND	0.35 ¹⁾	0.30 ¹⁾	0.37 ¹⁾	0.37 ¹⁾	ND	ND
17:0anteiso	ND	ND	0.07 ¹⁾	0.13 ¹⁾	0.10 ¹⁾	0.10 ¹⁾	0.13	ND

注: ND: not detected; 1) 仅在 1~2 个菌株中检出; 2) 30% 以上菌株中检出; 3) 并非在所有菌株中均检出

2.2 猪霍乱、肠炎沙门氏菌脂肪酸组成与 MIDI 数据库中数据比较

与 MIDI 数据库不同的是, 本次检测的肠炎沙门氏菌分离

株具有另外 4 种共有成分 13:0、16:1ω5c、14:02OH、18:1ω9c; 猪霍乱沙门氏菌具有另外两种共有成分 16:1ω5c、18:1ω9c, 而缺少了 19:0iso。这些成分都属于微量脂肪酸成

分, 其中含量最高的是 0.90%。本实验中肠炎沙门氏菌 17:0 含量低于数据库数据, 而 18:0 含量远高于库中值; 猪霍乱沙门氏菌 17:0cyclo 含量远低于数据库数值, 而 18:0 含量高于库中值。

2.3 沙门氏菌属水平的判断能力

117 株沙门氏菌分离株脂肪酸图谱经 MIDI 数据库比对, 第一选择判断为沙门氏菌且 $SI \geq 0.700$ 的有 84 株, 符合率为 71.8%。未被准确鉴定的菌株中 12 株被鉴定为弗格森埃希氏菌、7 株被鉴定为肺炎克雷伯氏菌、7 株被鉴定为大肠埃希氏菌、5 株被鉴定为阴沟肠杆菌、2 株被鉴定为志贺氏菌。而被匹配成其他肠杆菌的菌株中 84.8% 为 MIDI 数据库中没有的血清型。

2.4 沙门氏菌不同血清型的鉴别能力

14 株猪霍乱沙门氏菌, 7 株准确判断为猪霍乱, 6 株判断为邦戈; 6 株肠炎沙门氏菌, 2 株判断为邦戈, 1 株判断为猪霍乱, 1 株判断为鼠伤寒; 24 株山夫登堡沙门氏菌, 10 株判断为鼠伤寒, 6 株判断为邦戈, 2 株判断为猪霍乱; 20 株阿贡纳沙门氏菌, 7 株判断为猪霍乱, 6 株判断为邦戈, 2 株判断为伤寒; 23 株德尔卑沙门氏菌, 8 株判断为邦戈, 6 株判断为猪霍乱, 2 株判断为伤寒, 1 株判断为肠炎; 15 株鸭沙门氏菌, 5 株判断为邦戈, 4 株判断为鼠伤寒, 1 株判断为猪霍乱沙门氏菌; 8 株伊鲁木沙门氏菌, 3 株判断为猪霍乱, 3 株判断为邦戈; 7 株明斯特沙门氏菌株, 4 株判断为邦戈。

所有肠炎沙门氏菌均未判断准确, 所有检测菌株中只有一株被错误判断为肠炎沙门氏菌。可认为 MIDI 数据库中肠炎沙门氏菌脂肪酸数据与试验菌株有较大差异。

未被准确判断的菌株中 54.4% 被判断为邦戈沙门氏菌, 22.2% 被判断为猪霍乱沙门氏菌, 16.7% 被判断为鼠伤寒沙门氏菌。

3 讨论

MIDI 数据库中肠杆菌共有脂肪酸成分有 12:0、14:0、16:0、17:0cyclo、SumInFeature2、SumInFeature3、SumInFeature8, 这些成分也包含在本次实验菌株的共有成分中, 且全部为主要脂肪酸成分。这说明肠杆菌科细菌间主要脂肪酸成分极为接近, 只有微量脂肪酸成分的差异。而 MIDI 数据库中只有 5 种血清型沙门氏菌的脂肪酸数据, 本次检测的河北省流行株中仅有两种血清型包含在其中, 也是造成鉴定结果假阴性率较高的原因。

肠杆菌科细菌在肠道菌选择性平板上不同的菌落生长特征

对脂肪酸鉴定结果的判断与选择有重要指导意义。在选择性平板 HE 上, 绝大多数埃希氏菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌等呈分解乳糖不产硫化氢的橘黄色菌落, 而绝大多数沙门氏菌不分解乳糖产硫化氢, 菌落为无色透明中心黑色, 虽然沙门氏菌可分解乳糖但同时产硫化氢, 菌落呈橘黄色中心黑色。通过菌落特征可很容易将以上细菌与沙门氏菌区分开来。只有伤寒沙门氏菌、鸡沙门氏菌与志贺氏菌、极少数分解乳糖的大肠埃希氏菌菌落特征均为无色透明不产硫化氢, 无法区分。通过菌落特征排除鉴定结果中不符合选项后, 本次检测沙门氏菌属的鉴定准确度提高至 92.3 ($SI \geq 0.700$)。

因此我们认为脂肪酸分型方法在菌株鉴定方面与菌落形态、生化特征等相结合将大大提高其应用价值。这与 James A Kellogg 等人的研究观点一致^[6]。

根据本实验我们认为, 应用气相色谱技术和 MIS 数据分析系统, 结合一定的检验基础知识, 可准确、方便的将沙门氏菌鉴定到属, 但由于我国沙门氏菌与构建 Sherlock 内置库所使用的沙门氏菌菌株在脂肪酸组成上的差异, 造成其分型能力的不足。本实验同时提供了中国沙门氏菌脂肪酸组成的本底资料。

参考文献:

- [1] Abel K, Schmertzing H, Peterson J I. Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition Feasibility of Utilizing Gas Chromatograph[J]. Bacterial, 1963, 85: 1039-1044.
- [2] White D, Findla Y R. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms [J]. Hydrobiologia, 1988, 159: 119-132.
- [3] Welch D F. Applications of cellular fatty acid analysis [J]. Clin Microbiol Rev, 1991, 4: 422-438.
- [4] 王秋红, 蓝江林, 朱育菁, 等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用 [J]. 福建农业学报, 2007, 22 (2): 213-218.
- [5] 刘志辉, 蔡杏珊, 竺澎波. 应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28: 403-406.
- [6] James A K, David A B, Gisela S W. Application of the Sherlock Mycobacteria Identification System Using High-Performance Liquid Chromatography in a Clinical Laboratory [J]. Clin Microbiol, 2001, 3: 964-970.

(收稿日期: 2008-12-08)

(上接第 4323 页)

- [2] Mario Matera, Guido Bellinghieri, Giluseppe Costantino, et al. History of L-Carnitine: Implications for renal disease [J]. J Ren Nutr, 2003, 13 (1): 2-14.
- [3] Atilla K, Coker A, Sagol O, et al. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury [J]. Clin Nutr, 2002, 21 (4): 309-313.
- [4] Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, et al. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, A-ASC) in dogs and in rats [J]. Comp Clin Path, 2005, 13: 190-194.
- [5] Ilavarasan R, Vasudevan M, Anbazhagan S, et al. Antioxidant ac-

tivity of Thespesia populnea bark extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 87 (2-3): 227-230.

- [6] Lee KJ, Jeong HG. Protective effects of Platycodi radix on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40 (4): 517-525.
- [7] Yashiyuki K, Hiroji O. Effects of stilbene compents of foots of polygonum on liver injury in peroxidized oil-fed rats [J]. Plant Med, 1983, 49: 51.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

(收稿日期: 2008-09-19)