

通过葡萄糖醛酸酶-半乳糖苷酶-色氨酸酶 (GGT) 试验快速检定大肠杆菌的研究

杨正时 钟 照
(中国药品生物制品检定所,北京)

谢奉喆 孙淑艳
(黑龙江省卫生防疫站,哈尔滨)

摘要 本文报告用纸片法检查 376 株细菌产生葡萄糖醛酸酶、半乳糖苷酶和色氨酸酶的能力 (GTT 试验), 97% 的大肠杆菌, 47.4% 的志贺氏菌, 41.1% 的沙门氏菌能产生葡萄糖醛酸酶。肠杆菌科的其它细菌, 包括枸橼酸杆菌, 产气肠杆菌, 阴沟肠杆菌, 蜂窝哈夫尼亚菌, 肺炎克雷伯氏菌, 爱德华氏菌, 沙雷氏菌属, 变形杆菌, 摩根氏菌属, 司徒氏普鲁非登斯菌(一株例外), 雷极氏普鲁非登斯菌和小肠结肠炎耶氏菌均不产生葡萄糖醛酸酶, 假单胞菌属中的绿脓杆菌、粪产碱杆菌以及弧菌科的美志贺邻单胞菌也为阴性。132 株大肠杆菌中, 90.9% 的菌株, 其葡萄糖醛酸酶-半乳糖苷酶-色氨酸酶的反应型式呈 +++ (3 小时), 而 215 株其它肠杆菌科细菌中仅有一株 (0.5%) 为此反应, 29 株非肠杆菌科细菌均不呈此反应 (0%), 因此, GTT 试验是一个快速特异地检定大肠杆菌的方法。

关键词 葡萄糖醛酸酶; 半乳糖苷酶; 色氨酸酶; 大肠杆菌

大肠杆菌是人和哺乳动物肠道正常菌丛组成部分, 某些类型的大肠杆菌对人畜具有致病性, 在食品卫生和公共卫生检验中常常作为评判粪源性污染的卫生指示菌, 因此大肠杆菌的鉴定无论在临床医学、卫生防疫、食品卫生和环境监测方面都是十分有意义的。大肠杆菌的鉴定一般均需经鉴别培养基平板分离, 系列糖发酵和其它生化试验项目证实, 耗时而费材, 近年国外应用酶学试验原理鉴别肠道细菌方面取得了进展。本文报告利用大肠杆菌与其它肠道杆菌产生葡萄糖醛酸酶 (β -Glucuronidase), 半乳糖苷酶 (β -D-Galactosidase) 和色氨酸酶 (Tryptophanase) 能力上的差异用于快速检定大肠杆菌的研究。

材料与方 法

1. 菌株: 大肠杆菌 132 株, 其中 106 株系

来自丹麦的 01~0112 间的标准菌株, 26 株为国内分离的侵袭性大肠杆菌 (EIEC), 其中 028ac:H-12 株, 029:H-2 株, 0112ac:H-2 株, 0124:H-4 株, 0152:H-2 株, 0164:H-4 株, 均经生化血清学证实, 能引起豚鼠角膜炎。志贺氏菌 114 株, 分布于 A-D 亚群, 其中标准株 23 株, 北京地区近年从临床标本中分离的 91 株沙门氏菌 56 株, 均为各 O 群标准菌株。其它肠杆菌科细菌尚有枸橼酸杆菌 (6 株), 产气肠杆菌 (1 株), 阴沟肠杆菌 (1 株), 蜂窝哈夫尼亚菌 (3 株), 肺炎克雷伯氏菌 (6 株), 爱德华氏菌 (地方株, 1 株), 粘质沙雷氏菌 (2 株), 变形杆菌 (5 株), 摩根氏杆菌 (以往称摩根变形杆菌, 1 株), 司徒氏普鲁非登斯菌 (10 株), 雷极氏普鲁非登斯菌 (以往称雷极变形杆菌, 1 株), 小肠结肠炎耶氏菌 (8 株), 共计肠杆菌科细菌 347 株。此外尚有绿脓杆菌 (1 株), 粪产碱杆菌 (1 株), 类

志贺邻单胞菌(地方株 27 株), 共计 376 株。除标明外, 均为菌种中心库存标准株。

2. 4-硝基苯吡喃葡萄糖苷(4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, 简称 PGUA) 琼脂平板: 由两部分组成:

(1) 脉脉 10 g, 酵母浸膏粉 5 g, KH_2PO_4 0.034 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.8 g, 蒸馏水 850 ml, 溶解后调 pH 到 8.0;

(2) 白陶土 20 g, 蒸馏水 150 ml, 用混悬器混匀。

混合 (1)、(2) 部分, 同时加入 PGUA 0.4 g (预溶于少量水中), 琼脂 15g, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌, 冷却到 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右时加入 5% 的十二烷基苯磺酸钠 (Dodecylbenzolsulphonate-Na) 溶液 3.5 ml, 最终 pH 为 7.6—7.8, 倒平板备用。

试验菌株点种于平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后检查生长菌苔黄色者为阳性。

3. PGUA 纸片: PGUA 1mg 溶于 pH 8.5 的 0.2mol/L Tris 溶液 1 ml 中。直径 6 mm 经高压灭菌后烤干的滤纸片, 浸吸 PGUA 溶液后 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 置小瓶内冰箱保存。每毫升试剂可供约 150 个纸片, 每一纸片约含 PGUA 6.5 μg 。

4. ONPG 纸片: 80 mg 邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 溶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 ml 蒸馏水中, 加 5 ml 1.0 mol/L NaH_2PO_4 溶液, 按方法 3 滴于纸片上。

5. 色氨酸酶试验: 吲哚产生按常规培养基方法检测, 同时应用色氨酸纸片法。2% 色氨酸溶液(需水浴加热溶解)滴纸片烤干。

6. 试验方法: 从营养斜面上刮取新鲜培养物制备盐水菌悬液二管和 0.2 mol/L Tris (pH 8.5) 菌悬液一管。每管 0.2 ml, 菌浓度约 200 亿/ml。在盐水菌悬液管中分别加入 ONPG 和色氨酸纸片各一片, 在 Tris 菌悬液管中加入 PGUA 纸片一片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 小时。ONPG 与 PGUA 纸片和溶液成黄色为阳性, 在色氨酸纸片管中加入 Kovac 试剂 1—2 滴, 红色为阳性。

结 果

(一) 纸片法与常规试验的结果比较

用不同代表型的 22 株菌株比较了 PGUA 琼脂平板法和纸片法的结果。PGUA 琼脂处方系从丹麦引进。原用于划线分离, 作者改用点种, 以节省培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 小时, 阳性菌株接种的培养基开始变黄, 过夜后, 生长的菌苔变成黄色, 菌苔周围的培养基也呈黄色, 继续在室放置, 则整个平板均弥散成黄色。影响对邻近阴性菌株的判断。纸片法在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1.5 小时, 阳性株即显反应, 纸片与菌悬液为淡黄色。有二菌株反应较弱, 待 3 小时后明显。阴性菌株均未见颜色变化。二法结果完全一致, 阳性 9 株, 阴性 13 株, 纸片法完全可以代替 PGUA 琼脂。

色氨酸酶用常规培养基方法测定吲哚产生, 常在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后进行, 纸片法在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 小时后加试剂, 二者结果完全一致, 8 株阳性, 14 株阴性。

由于以往的经验, 没有对 ONPG 常规法和纸片法对比, 但观察了不同时间 ONPG 纸片法的反应, 并与乳糖发酵作了比较。其中 10 株在水浴 30 分钟后即显黄色反应, 另外二株需经过夜后才显阳性。ONPG 与乳糖发酵不完全一致, 10 株 ONPG 阴性株, 也为乳糖不发酵株, ONPG 阳性的 12 株菌中, 6 株迅速发酵乳糖, 2 株迟缓发酵 (3 天后), 4 株不发酵乳糖 (观察 7 天)。不发酵乳糖的菌株, 有时 ONPG 反应需要过夜后才能判定。

(二) 不同菌属菌株的 GGT 反应

376 株菌中, 产生葡萄糖醛酸酶的有 205 株, 除一株司徒氏普鲁非登斯菌外, 均集中于大肠杆菌, 志贺氏菌, 沙门氏菌三个菌属中, 132 株大肠杆菌中有 128 株阳性, 阳性率为 97%, 志贺氏菌和沙门氏菌的阳性率分别为 47.4% 和 41.1%。大肠杆菌产生半乳糖苷酶和色氨酸酶的能力相似, 分别为 97% 和 95.5%; 志贺氏菌分别为 35.1% 和 49.1%; 而沙门氏菌的半乳糖苷酶阳性率为 14.3%, 均不产生色氨酸

表1 不同菌属菌株 GGT 反应

菌属(或种)	菌株数	阳性数		
		Glu	Gal	Try
大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	132	128	128	126
志贺氏菌 (<i>Shigella</i>)	114	54	40	56
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i>)	56	23	8	0
枸橼酸杆菌 (<i>Citrobacter</i>)	6	0	6	0
产气肠杆菌 [<i>Enterobacter (aerogenes)</i>]	1	0	1	0
阴沟肠杆菌 [<i>Enterobacter (cloacae)</i>]	1	0	1	0
蜂窝哈夫尼亚菌 (<i>Hafnia alvei</i>)	3	0	1	0
肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	6	0	1	0
缓慢爱德华氏菌 (<i>Edwardsiella tarda</i>)	1	0	0	1
粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescens</i>)	2	0	2	0
变形杆菌 (<i>Proteus</i>)	5	0	0	4
摩根氏菌 (<i>Morganella morganii</i>)	1	0	0	1
司徒氏普鲁非顿斯 (<i>Providencia stuartii</i>)	10	1	0	8
雷极氏普鲁非顿斯 (<i>Providencia rettgeri</i>)	1	0	0	1
小肠结肠炎耶氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	8	0	6	3
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	1	0	0	0
粪产碱杆菌 (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	1	0	0	0
类志贺邻单胞菌 (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	27	0	24	26

GGT: 分别表示葡萄糖醛酸酶 (Glu), 半乳糖苷酶 (Gal), 色氨酸酶 (Try)

酶。肠杆菌科的其它细菌, 有的也具有产生半乳糖苷的能力, 但不产生色氨酸酶, 具有产生色氨酸酶能力的菌株, 却不产生半乳糖苷酶。小肠结肠炎耶氏菌稍有不同, 在 6 株 ONPG 阳性菌株中, 有 2 株是产生色氨酸酶的。绿脓杆菌为假单胞菌属, 粪产碱杆菌为不发酵葡萄糖的革兰氏阴性杆菌, 在形态学上和肠杆菌科接近, 三种酶试验均为阴性。类志贺邻单胞菌为弧菌科中的直杆状细菌, 该类菌株迟缓发酵乳糖, 并与某些志贺氏菌抗原原有交叉。27 株菌中, ONPG 阳性的有 24 株, 并均产生色氨酸酶, 但不产生葡萄糖醛酸酶。上述结果详见表 1, 因此, 对三种酶均有较高阳性率的仅有大肠杆菌和志贺氏菌属菌株。

(三) 志贺氏菌和大肠杆菌的 GGT 反应模式

志贺氏菌对 GGT 的反应与血清亚群有关。产生葡萄糖醛酸酶的能力, A 亚群 6 株中有 2 株阳性, C、D 亚群的阳性率较高, 分别达 75% 和 81.6%, B 亚群为 16.7%。对半乳糖苷酶的反应, A、B 亚群的阳性率低, D 亚群的阳

表2 志贺氏菌的 GGT 反应

亚群	Glu	Gal	Try	菌株数	%
A(痢疾志贺氏菌)	+	-	+	1	16.7
	+	-	-	1	16.7
	-	-	+	3	50.0
	-	-	-	1	16.7
B(福志贺氏菌)	+	+	-	1	1.9
	+	-	+	3	5.6
	+	-	-	5	9.3
	-	-	-	4	7.4
	-	-	+	41	75.9
C(鲍志贺氏菌)	+	+	+	1	6.3
	+	+	-	1	6.3
	+	-	-	4	25.0
	+	-	+	6	37.5
	-	-	+	1	6.3
	-	-	-	3	18.8
D(宋志贺氏菌)	+	+	-	31	81.6
	-	+	-	6	15.8
	-	-	-	1	2.6

性率高达 97.4%, 但所有 D 亚群菌株均不产生色氨酸酶(表 2)。

志贺氏菌有七种 GGT 的反应模式, 常见

的为“--+”(39.5%)和“++-”(28.9%)。反应模式“--+”,主要存在于福氏志贺氏菌,而“++-”主要存在于宋内氏志贺氏菌,这两种菌型均为国内常见的型别,因此这二种模式的比例取决于菌株的来源与型别。“+++”模式仅有一株,占志贺氏菌的0.7%,该株为鲍氏15型(菌号51591),是从山东淄博地区分离而入选的标准株,在37℃培养14天时发酵乳糖,是十分罕见的菌株,其它的鲍氏15型菌株不具有这种性状。

132株大肠杆菌对GGT有五种不同的反应模式(表3),其中模式为“+++”的有120株(90.9%),其它模式中多数为二种酶阳性,仅2株为“--+”模式,这2株是EIEC 0112 ac:H-。在26株EIEC中,呈典型反应的有24株,因此,大多数EIEC菌株也可用GGT试验予以确定。在215株非大肠杆菌的肠杆菌科细菌中,“+++”模式为0.5%,因此模式“+++”检定大肠杆菌是比较特异的。

志贺氏菌与大肠杆菌相同反应模式的菌株只能使用其它的生化试验予以鉴别。

表3 大肠杆菌和志贺氏菌GGT反应模式

GGT 反应模式	大肠杆菌		志贺氏菌	
	菌株数	%	菌株数	%
+++	120	90.9	1	0.8
++-	6	4.6	33	28.9
+--	0	0	10	8.8
+-+	2	1.5	10	8.8
-+-	0	0	6	5.3
--+	2	1.5	45	39.5
-++	2	1.5	0	0
---	0	0	9	7.9
总计	132	100.0	114	100.0

讨 论

在临床标本中从肠道鉴别培养基上分离到疑似大肠杆菌时,需接种于双糖或三糖铁斜面作初步鉴别,在大多数情况下要检查更多的生化试验项目才能确定。在食品卫生,药品,水质检查时常采用MPN法,并对阳性的发酵管进行分离,用特征性生化反应(常用IMViC)来

予以证实。无论何种检验程序,均需在数天后方获正确的判断。

1976年Kiliam等^[1]研究了肠杆菌科和弧菌科细菌对多种糖苷酶(Glycosidases)的反应,发现97%的大肠杆菌,50%的志贺氏菌能够产生 β -葡萄糖醛酸酶,在4小时内使色原性基底物成为黄色。Le Minor检查了4000多株沙门氏菌,约30%的菌株也具有此酶。Maddocks^[2]用细菌葡萄糖醛酸酶作用于不发荧光的底物4-甲基伞形花内酯- β -D-葡萄糖苷酸(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide),使释放出在紫外线下具有荧光的甲基伞形酮(methylumbelliferone)来鉴别大肠杆菌。Feng等^[3]将4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(4-methylumbelliferone glucuronide, MUG)掺入于MPN营养肉汤管中,同时观察假设试验(产气)和证实试验(发荧光)的结果,约90%的试验物在有粪源性大肠杆菌污染时,产气和发荧光,没有假阳性。Robison等^[4]认为该法与常规法相比,相符率为94.8%,假阳性率为4.8%,无假阴性,并认为在应用此法证实大肠杆菌时,可不必再用其它生化试验。近年对该法又有了一些改进,增加了半乳糖苷酶和吲哚产生试验,以增加诊断大肠杆菌的特异性。Edberg等^[5]比较了RDE和RIM二种商品试剂,用单管法同时测定这三种酶活性,并与常规法进行对比。若从血琼脂平板上取菌,葡萄糖醛酸酶的RDE法95%与常规法相符,RIM法相符率仅46%。若从麦康凯琼脂平板上取菌,由于菌落被中性红染上红色,同时发酵碳水化合物后引起的pH下降,干扰了荧光的发生,为此,必须延长培育时间和加入Na₂CO₃。另外,ONPG和吲哚产生也较弱。若从伊红美蓝琼脂取菌,由于菌落深染并具荧光,因而三种酶试验均受到严重干扰,无法判断结果。

本文根据国内的实际使用情况使用PGUA纸片法,结果令人满意。用PGUA测定,只有大肠杆菌,志贺氏菌和沙门氏菌产生 β -葡萄糖醛酸酶,其阳性率大肠杆菌为97%,志贺氏菌为47.4%,沙门氏菌为41.1%。与上述文献^[1]报告

相符。其它肠杆菌科细菌,假单胞菌属和弧菌科细菌均不产生 β -葡萄糖醛酸酶。由于本文中应用营养琼脂培养,不存在色素干扰的问题,一株沙雷氏菌产生红色素,并不影响 ONPG 结果观察,本文中的纸片法可代替常规试验用。

132株大肠杆菌中,不产生葡萄糖醛酸酶的有4株,其中3株为 EIEC(0112ac:H- 2株,029:H- 1株),另一株为 019:H7。虽然几乎所有的大肠杆菌均具有这种性状,但尚有40%以上的志贺氏菌和沙门氏菌也为阳性,为了确定大肠杆菌,补充半乳糖苷酶和色氨酸酶试验是十分必要的。90.9%的大肠杆菌三个酶(GGT)反应模式为“+++”。许多生化性状酷似志贺氏菌的 EIEC,大多也呈此反应模式。虽然以这一典型模式作大肠杆菌检定依据时,遗漏了吲哚阴性的大肠杆菌,但排除了相似反应的志

贺氏菌,从而大大地提高了大肠杆菌诊断的特异性。在114株志贺氏菌中,仅有一株(0.7%)具有此反应模式,此株为生物学性状十分特殊的鲍氏15型,迟缓14天发酵乳糖。在215株非大肠杆菌的其它肠道杆菌中具有此反应模式的仅为0.5%。因此利用 GGT 试验可以快速地检定与证实大肠杆菌。

参 考 文 献

- [1] Kilian M et al.: *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 84: 245—251, 1976.
- [2] Maddocks JL et al.: *J. Clin. Pathol.* 28: 686—687, 1975.
- [3] Feng PCS et al.: *Appl Environ Microbiol* 43: 1320—1329, 1982.
- [4] Robison BJ et al.: *Appl Environ Microbiol* 48: 285—288, 1984.
- [5] Edberg SC et al.: *J. Clin Microbiol* 24(3): 368—371, 1986.