

应用肠杆菌科四个属的诊断噬菌体快速诊断沙门氏菌

何晓青* 潘若男** 张淑贞* 孙吉昌*

吴晓明* 汪建民** 陆佩华*

本文报告应用弗氏柠檬酸细菌噬菌体 3 组,大肠埃希氏菌噬菌体 4 组,阴沟肠杆菌噬菌体 1 组和沙门氏菌 O-I 噬菌体快速诊断沙门氏菌的结果。

沙门氏菌 O-I 噬菌体可裂解沙门氏菌属地方株 1393 株中的 1351 株 (97%)。柠檬酸细菌属噬菌体 ϕ I、 ϕ II 和 ϕ III 共可裂解柠檬酸细菌属地方株 381 株中的 362 株 (95%)。阴沟肠杆菌噬菌体 Ent 可裂解阴沟肠杆菌地方株 158 株中的 133 株 (84.2%)。埃希氏菌属噬菌体 E-1、E-2、E-3 和 E-4 共可裂解埃希氏菌属地方株 683 株中的 567 株 (83%)。由于 E-1 和 E-2 噬菌体的联合使用,可使 O-I 噬菌体对埃希氏菌属地方株的误诊率从 6.3% 下降到 0.6%。E-4 噬菌体对沙门氏菌属地方株的误诊率可因与 O-I 噬菌体的联合使用而从 0.36% 下降到 0.07%。

四个菌属的噬菌体联合使用,可以快速诊断这四个菌属 2903 株中的 2656 株 (91.5%)。使需要做生化鉴别试验的菌株大为减少。属外交叉反应极低,试验结果可靠。用这一方法作沙门氏菌属的快速诊断,直接挑取菌落作噬菌体裂解试验,6 小时可得出结果。方法简单,不需要特殊设备,一般细菌实验室均可以进行,可以节省大量的人力和物力,显著地提高工作效率。

关键词 肠杆菌科;沙门氏菌属;诊断噬菌体

1954 年,Cherry 发现乙型副伤寒沙门氏菌噬菌体分型中所用的一株噬菌体,称为 O-I 噬菌体,在高浓度时对绝大部分沙门氏菌均可以裂解,具有属的特异性^[1]。Thal^[2] 和 Seeliger^[3] 等人相继证实了这一点,并有人把它作为沙门氏菌新菌型的鉴定项目^[4]。Buckemühl^[5] 将沙门氏菌各个亚属的菌株作了裂解试验,证明 O-I 噬菌体对亚属 I、II 和亚属 III 双相菌的绝大多数菌株可以裂解,亚属 III 单相菌只少数裂解,亚属 IV 则不裂解。Fey 致力于将 O-I 噬菌体用于沙门氏菌的快速诊断^[6,7],总的裂解率可达 96—97%,不裂解的菌株分布于各个 O 群内,但以 E 群为多,且对大肠埃希氏菌的交叉裂解可高达 10%。为了改善对 E 群沙门氏菌的诊断效果,Güdel^[8] 在 O-I 噬菌体内加入 Gershtman 的 G47 噬

菌体^[9],但仍未能使全部沙门氏菌裂解。

上述文献报告 O-I 噬菌体对沙门氏菌的裂解率在 85—97% 之间。对 O-I 噬菌体呈阴性反应的沙门氏菌菌株数量不多,但需要进行鉴别的属外菌株是很多的,常比沙门氏菌多 10—20 倍,至少也数倍于沙门氏菌。为了发现噬菌体裂解试验阴性而漏诊的沙门氏菌,大量的生化学鉴定工作仍不可缺少。

在粪便中大量存在的正常菌类有大肠埃希氏菌、弗氏柠檬酸细菌和阴沟肠杆菌等。在过去四年中,我们已分别分离并筛

本文于 1982 年 8 月 2 日收到。

* 江西省卫生防疫站

** 南昌市医学科学研究所

景德镇市、九江市、上饶地区、宜春地区、上饶市、赣州市、吉安市、龙南县和山东聊城地区卫生防疫站提供菌株,特此致谢。

选出具有属特异性裂解作用的埃希氏菌属噬菌体^[10]、柠檬酸细菌属噬菌体^[11]和阴沟肠杆菌噬菌体。本文报告联合使用这些噬菌体和沙门氏菌 O-I 噬菌体,快速诊断沙门氏菌的结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 标准菌株: 沙门氏菌属 (*Salmonella* sp.) 99 株, 弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 33 株, 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 143 株, 发碱-殊异菌类 (Alkalescens-Dispar group) 13 株, 志贺氏菌属 (*Shigella* sp.) 57 株, 均系来自卫生部药品生物制品检定所 CMCC(B)。

2. 地方菌株: 沙门氏菌属 (*Salmonella* sp.) 1393 株, 弗氏柠檬酸细菌 (*C. freundii*) 381 株, 大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 683 株, 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 158 株, 其他 116 株, 其中包括产气肠杆菌 (*Ent. aerogenes*) 23 株, 产气克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 5 株, 蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) 35 株, 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 3 株, 异型柠檬酸细菌 (*Citrobacter diversus*) 4 株, 变形杆菌属 (*Proteus* sp.) 16 株, 摩根氏菌属 (*Morganella* sp.) 3 株, 普罗威登斯菌属 (*Providencia* sp.) 4 株, 不凝集弧菌 (unagglutinable vibrio) 11 株, 气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.) 4 株, 绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 5 株, 不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 3 株, 均系自病人粪便所分离。

(二) 噬菌体

沙门氏菌 O-I 噬菌体系卫生部药品生物制品检定所 CMCC(B) 从国外引进后转发给我们的。柠檬酸细菌属噬菌体、埃希氏菌属噬菌体和阴沟肠杆菌噬菌体均系我们两个实验室所分离。按 Adams 的方法^[12]制备高效价噬菌体液:

1. 沙门氏菌属噬菌体 O-I, 10⁸RTD。
2. 柠檬酸细菌属噬菌体 C, 由 ϕ I 和 ϕ III 混合而成, 其效价均达到 10⁸RTD。
3. 埃希氏菌属噬菌体 E, 由 E-1 和 E-2 混合而成, 其中 E-1 为 10⁸RTD, E-2 为 10⁴RTD。
4. 噬菌体 CE, 采用柠檬酸细菌属噬菌体 ϕ II 或埃希氏菌属噬菌体 E-3, 均达到 10⁸RTD。

5. 埃希氏菌属噬菌体 E-4, 10⁴RTD。

6. 阴沟肠杆菌噬菌体 Ent, 10⁶RTD。

经无菌试验合格, 分装于灭菌的 1ml 安瓿内, 标明生产日期和效价, 保存于 4℃ 冰箱备用。

(三) 培养基

营养肉汤、营养琼脂和半固体营养琼脂, 均按前文^[10, 11]制备。

(四) 裂解试验方法

基本上采用前文^[10]的方法进行试验, 有时亦采用斑点试验法^[12]。经 37℃ 培养 (有时增加 46℃ 培养, 因为柠檬酸细菌属中有 10% 的菌株可在 46℃ 时被裂解), 6 小时和过夜观察结果。结果记录: 融合性裂解 (CL), 半融合性裂解 (SCL), 不透明融合性裂解 (OL), 不裂解 (-)。

结 果

(一) 沙门氏菌 O-I 噬菌体的裂解试验

O-I 噬菌体对沙门氏菌属标准株 99 株裂解 73 株 (73.8%), 其中亚属 III 单相菌裂解率很低, 23 株中仅 3 株裂解。而对亚属 I、II 和亚属 III 双相菌 76 株中裂解 70 株 (92.1%) (表 1)。O-I 不裂解的, 在亚属 I 中有 M、O、V、X 及 52 等 O 群, 在亚属 II 中为 U 群。

对沙门氏菌属地方株 1393 株中共裂解 1351 株 (97.0%)。各 O 群的试验株数、裂解株数和裂解率见表 2。不裂解的有 B 群 1 株 (乙型副伤寒沙门氏菌), C₂ 群 10 株 (纽波特沙门氏菌), D 群 4 株 (伤寒沙门氏菌), E₁ 群 21 株 (鸭沙门氏菌 13 株, 火鸡沙门氏菌 8 株), N 群 3 株 (拉马特根沙门氏菌)。

O-I 噬菌体尚可裂解大肠埃希氏菌标准株 143 株中的 23 株 (16.1%) 及地方株 683 株中的 43 株 (6.3%) 和志贺氏菌属标准株 57 株中的 1 株 (鲍氏志贺氏菌 13 型 *Shigella boydii* 13)。对弗氏柠檬酸细菌的标准株 (33 株) 及地方株 (381 株)、阴沟肠

表 1 沙门氏菌属三个亚属标准株用 O-I 和 E-4 噬菌体试验结果

Table 1 Results from type strains of subgenus in *Salmonella* tested by phages O-I and E-4

亚·属 Subgenus	株 数 No. of strains	裂解株数 No. of lysed strains		
		O-I CL E-4-	O-I CL E-4 CL	O-I- E-4 CL
I	61	47	9	2
II	12	9	2	1
III, 双相 diphasic	3	2	1	0
III, 单相 monophasic	23	2	1	5
共 计 Total	99	60	13	8

表 2 沙门氏菌属各 O 群地方株用 O-I 噬菌体的试验结果

Table 2 Results from local strains of various O serogroups in *Salmonella* tested by phage O-I

O 群 O serogroup	株 数 No. of strains	裂解(%) Lysed (%)	不裂解的菌 Unlysable species
A	2	2(100)	
B	507	506(99.8)	<i>S. paratyphi</i> B(1)*
C ₁	83	83(100)	
C ₂	193	183(94.8)	<i>S. newport</i> (10)
D	46	42(91.3)	<i>S. typhi</i> (4)
E ₁	441	420(95.2)	<i>S. anatum</i> (13) <i>S. meleagridis</i> (8)
E ₄	5	5(100)	
F	1	1	
I	8	8(100)	
N	6	3(50)	<i>S. ramat-gan</i> (3)
Q	6	6(100)	
61**	11	11(100)	
unknown	84	81(96.4)	
共 计 total	1593	1351(97.0)	

* 括号内为不裂解的株数。

** 亚属 III 的双相菌。

* The number of unlysable strains was indicated in paranthesis.

** Diphasic strains in subgenus III.

杆菌(158株)、产气肠杆菌(23株)、产气克雷伯氏菌(5株)、蜂房哈夫尼菌(35株)、粘质沙雷氏菌(3株)、异型柠檬酸细菌(4株)、变形杆菌属(16株)、摩根氏菌属(3株)、普罗威登斯菌属(4株)、不凝集弧菌(11株)、气单胞菌属(4株)、绿脓假单胞菌(5株)和不动杆菌属(3株)均无裂解作用。

(二) 肠杆菌科四个属诊断噬菌体的裂解试验

表 3 指出,噬菌体 C(即 $\phi I + \phi III$) 可裂解弗氏柠檬酸细菌标准株 33 株中的 23 株(69.7%) 和地方株 381 株中的 320 株(84.0%)。除沙门氏菌属亚属 III 的标准株 47005 和阴沟肠杆菌 5 株外,对其他各菌

属的试验菌株均无裂解作用。菌株 47005 的抗原式为 Ar6:1, 2, 5 (62:Z₄, Z₂₃), 经血清学试验证明 O62 抗原无误; 但该菌株在 KCN 中生长, pH 7.0 尿素酶试验阳性, 赖氨酸脱羧酶试验阴性, 应属于典型的弗氏柠檬酸细菌。

噬菌体 E (即 E-1 + E-2) 可裂解大肠埃希氏菌标准株 143 株中的 120 株 (83.9%) 和地方株 683 株中的 510 株 (74.7%), 发碱-殊异菌类 13 株中的 4 株。除尚可裂解志贺氏菌属标准株 57 株中的 53 株 (93.0%) 和弗氏柠檬酸细菌的标准株 48083 外, 对其他各菌属的试验菌株均无裂解作用。48083 系弗氏柠檬酸细菌 O31 群的代表株, 该菌株赖氨酸脱羧酶试验为阳性, 在 KCN 中不生长, 不产生尿素酶, 不产生 H₂S, 西蒙氏柠檬酸盐试验阴性, 应属于埃希氏菌属, 已于前文^[4]报告。

噬菌体 CE (即 ϕ II 或 E-3) 可裂解弗氏柠檬酸细菌标准株 10 株 (30.3%) 及地方株 43 株 (11.3%); 并可裂解大肠埃希氏菌标准株及地方株、发碱-殊异菌类和志贺氏菌属的一部分菌株。对沙门氏菌属、阴沟肠杆菌和其他地方菌株均无裂解作用。

根据以上结果, 噬菌体 C 和 CE 共可裂解弗氏柠檬酸细菌标准株 33 株中的 32 株 (97%) 和地方株 381 株中的 362 株 (95%)。

噬菌体 E-4 可裂解大肠埃希氏菌标准株及地方株、发碱-殊异菌类和志贺氏菌属的一部分菌株。并可裂解弗氏柠檬酸细菌 381 株中的 2 株。对阴沟肠杆菌和其他地方菌株均无裂解作用, 但可裂解沙门氏菌属标准株 21 株 (21.2%) 和地方株 5 株 (0.36%)。

根据以上结果, 噬菌体 E、CE 和 E-4 共可裂解大肠埃希氏菌标准株 128 株 (89.5%) 和地方株 567 株 (83%)。

噬菌体 Ent 只裂解阴沟肠杆菌地方株 158 株中的 133 株 (84.2%), 对其他各菌属均无裂解作用。

由于噬菌体 E 的使用, 可以正确地判定埃希氏菌属, 使 O-I 噬菌体对大肠埃希氏菌的误诊率自 16.1% (标准株) 和 6.3% (地方株) 降低到 0.7% (标准株 1 株) 和 0.6% (地方株 4 株)。

噬菌体 E-4 由于和 O-I 联合使用, 可使沙门氏菌属地方株的误诊率自 0.36% 下降到 0.07% (1 株)。

四个菌属的噬菌体联合使用, 可以快速诊断这四个菌属 2903 株中的 2656 株 (91.5%)。

讨 论

试验结果证明, 采用肠杆菌科诊断噬菌体, 可以快速诊断最常见的四个菌属中约 90% 的菌株, 属外交叉反应极低, 试验结果可靠, 使需要生化鉴别试验的菌株下降到全部菌株的 10% 左右。用这一方法进行沙门氏菌的快速诊断, 方法简单, 不需特殊设备, 一般细菌实验室均可进行, 可以节省大量人力和物力, 显著地提高工作效率。

我们建议采用以下的试验方法:

1. 在鉴别培养基上用接种针轻沾可疑菌落, 在 2ml 脓水管管壁上研磨洗下, 混和均匀, 立刻进行以下试验。如果采用混浊的肉汤培养液, 必须作 1:200 稀释。因为诊断噬菌体的溶菌反应对于多数菌株来说, 是大量噬菌体吸附在细菌细胞壁上, 从细胞外使细菌裂解。为了保证有足够的噬菌体吸附到每个细菌细胞的表面, 即每个细胞吸附数百个有感染能力的噬菌体, 故试验菌液一定要进行高度的稀释。

2. 用灭菌棉签沾取稀释菌液, 在已烘干的琼脂平板上作条状涂布。每个 9cm

平板可供检查 4 个菌株。剩余的脓水经 37℃ 培养过夜,以备必要时做靛基质试验和其他生化试验。

3. 用配有 4 $\frac{1}{2}$ 号针头的乳头滴管依

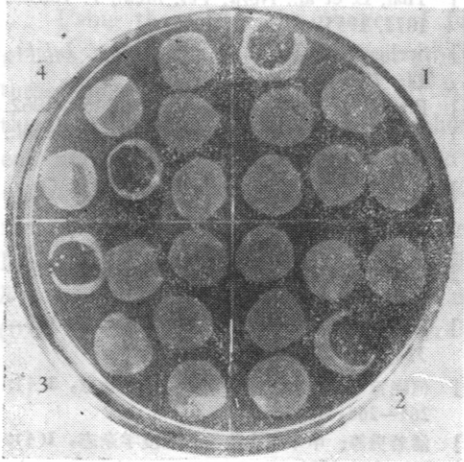


图 1

1. 沙门氏菌属,被 O-1 噬菌体裂解;
2. 柠檬酸细菌属,被 C 噬菌体裂解;
3. 埃希氏菌属,被 E 噬菌体裂解;
4. 柠檬酸细菌属,被 CE 噬菌体裂解。

Fig. 1

1. *Salmonella*, lysed by phage O-1.
2. *Citrobacter*, lysed by phage C.
3. *Escherichia*, lysed by phage E.
4. *Citrobacter*, lysed by phage CE.

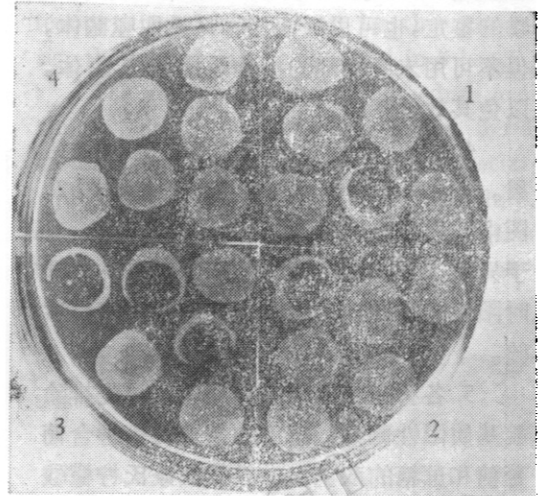


图 2

1. 埃希氏菌属,被 E-4 噬菌体裂解;
2. 阴沟肠杆菌,被 Ent 噬菌体裂解;
3. 埃希氏菌属,同时被 E、CE、E-4 噬菌体裂解;
4. 未分类,不被 O-1、C、E、CE、E-4、Ent 噬菌体裂解。

Fig. 2

1. *Escherichia*, lysed by phage E-4.
2. *Enterobacter cloacae*, lysed by phage Ent.
3. *Escherichia*, lysed by phages E, CE, and E-4 in the same time.
4. Untypable, not lysed by O-1, C, E, CE, E-4 and Ent.

表 4 肠杆菌科诊断噬菌体简化诊断表

Table 4 A simplified scheme for Enterobacteriaceae diagnostic phage set

噬菌体裂解模式 Lyso-pattern						判定菌属 Genus diagnosis
O-1	C	E	CE	E-4	Eat	
CL	-	-	-	(-)	-	<i>Salmonella</i>
-	CL	-	(-)	(-)	-	<i>Citrobacter</i>
(-)	-	CL	.	.	-	<i>Escherichia, Shigella</i>
-	-	-	CL	-	-	<i>Citrobacter, Escherichia, Shigella</i>
-	-	-	.	CL	-	<i>Escherichia</i>
-	(-)	-	-	-	CL	<i>Enterobacter cloacae</i>
-	-	-	-	-	-	untypable 未分类

(-) 偶有裂解发生
 . 裂解或不裂解
 (-) Lysis seldom occurred
 . Lysis or unlysiabl

次滴加 6 种诊断噬菌体,其顺序为: O-I、C、E、CE、E-4、Ent。如只作 1—2 株培养物的鉴定,也可用灭菌接种环挑取噬菌体,但不可用未经冷却的接种环挑取噬菌体,以免其效价下降。

4. 于 37°C 培养 6 小时和过夜,观察结果。按照表 4 判定菌属(参见图 1 和图 2,图中系用斑点试验法)。为了避免误诊,对于只有 E-4 噬菌体阳性或 O-I 和 E-4 同时阳性的菌株,可在脓水管内作靛基质试验。

5. 各种噬菌体均不裂解者,可先排除靛基质阳性菌株,留下的菌株再接种含葡萄糖和蔗糖的双糖铁,并做西蒙氏柠檬酸盐、pH 7.2 尿素酶、KCN、赖氨酸脱羧酶、V-P、苯丙氨酸脱氨酶、动力等试验。

6. 根据噬菌体或生化试验的结果判定为沙门氏菌属的菌株,再做血清学试验确定菌型。

STUDIES ON THE RAPID DIAGNOSIS OF SALMONELLA BY MEANS OF THE DIAGNOSTIC PHAGE SET FOR FOUR GENERA OF ENTEROBACTERIACEAE

He Xiaoqing* Pan Ruonan** Zhang Shuzhen* Sun Jichang*
Wu Xiaoming* Wang Jianmin** Lu Peihua*

Three groups of *Citrobacter* phages, four groups of *coli* phages, and one group of *cloacae* phages, were isolated which exhibit diagnostic value for the four genera of Enterobacteriaceae. The present paper reported the results that were obtained by means of these diagnostic phages and the *Salmonella* phage O-I in *Salmonella* rapid diagnosis.

The *Salmonella* phage O-I lysed 1351 (97%) from 1393 of the *Salmonella* local strains. The *Citrobacter* phages ϕ I, ϕ II and ϕ III lysed 362 (95%) of 381 of the

参 考 文 献

- [1] Cherry, W. B. et al.: *J. Lab. Med.*, **44**: 51, 1954.
- [2] Thal, E. et al.: *Nord. Vet. Med.*, **7**: 1063—1071, 1955.
- [3] Seeliger, H. P. R. et al.: *Z. Hyg. Infekt.*, **14**: 7529, 1961.
- [4] Brede, H. D.: *J. Bacteriol.*, **83**: 1164, 1962.
- [5] Bockemühl, J.: *Med. Microbiol. Immunol.*, **158**: 44, 1972.
- [6] Fey, H. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig.*, **A218**: 376—389, 1971.
- [7] Fey, H. et al.: *ibid.*, **A240**: 7—15, 1978.
- [8] Güdel, K. and H. Fey: *ibid.*, **A249**: 220—224, 1981.
- [9] Gershman, M.: *J. Clin. Microbiol.*, **5**: 302—314, 1977.
- [10] 何晓青等: 中华微生物学和免疫学杂志, **3**(4): 264—268, 1983.
- [11] 潘若男等: 中华微生物学和免疫学杂志, **1**(4): 260—264, 1981.
- [12] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publ. Inc., New York, 1959.

Citrobacter local strains. The *cloacae* phages Ent lysed 133 (84.2%) from 158 of the local strains of *Enterobacter cloacae*. And the *coli* phages E-1, E-2, E-3 and E-4 lysed 567 (83%) from 683 of the *Escherichia* local strains. The mistaken proportion of phage O-I to local *Escherichia* strains can be reduced from 6.3% to 0.6%.

* Phage-typing Reference Laboratory of *Salmonella typhimurium*, CMCC(B), Jiangxi Public Health and Epidemiological Station, Nanchang.

** Department of Microbiology, Nanchang Institute of Medical Science, Nanchang.

when it was used with phage E-1 and E-2. The mistaken proportion of phage E-4 to local *Salmonella* strains can be reduced from 0.36% to 0.07%, when it was used with phage O-I.

Using the set of the phages of four genera, 2656 (91.5%) of 2903 strains of these genera can be identified rapidly. And the strains examining by routine biochemical differentiation test can be reduced to about 10% of total strains. The cross reactions between these genera are very low. The local *Salmonella* strain showing *Escherichia coli* lyso-pattern is only one (0.07%), and the local *E. coli* strains

showing *Salmonella* lyso-pattern are four (0.6%). In *Salmonella* rapid diagnosis, testing the picked colony by this phage set, the results can be obtained in 6 hours.

The advantages of this procedure are simple, and less expensive. The most manual labour can be saved, and special equipment is unnecessary. The procedure can be used in common laboratory, and the technical efficiency will be improved conspicuously.

Key words

Enterobacteriaceae; *Salmonella*; Diagnostic phage