

应用肠杆菌科诊断噬菌体检测志贺氏菌的评价

李景学 周国清 温宪勤 于钦问 孙启华 崔树玉

(山东省卫生防疫站 济南 250014)

摘要 应用肠杆菌科诊断噬菌体对 2280 株疑似志贺氏菌进行了检测,同时进行了常规鉴定。结果表明,志贺氏菌属 Sh 噬菌体 10^3 RTD 对属内裂解率为 100%, 1RTD 为 99.9%; 65 株与志贺氏菌分型血清呈现凝集的非志贺氏菌, 10^3 RTD 裂解率为 12.3%, 1RTD 为 4.6%。裂解模式的测定表明, 2215 株志贺氏菌分属于 7 个裂解模式, 仅模式 3 中 3 株鲍氏 5 型为文献 [2, 3] 所未列入, 余者完全一致。Sh 10^3 RTD 裂解的非志贺氏菌均可用 1RTD 和裂解模式排除。另外 20 株具有志贺氏菌相关抗原的侵袭性大肠菌, 也可用 Sh 噬菌体 10^3 RTD、1RTD 裂解试验和裂解模式进行鉴别。

关键词 噬菌体裂解模式; 肠杆菌科; 志贺氏菌; 侵袭性大肠杆菌

80 年代我国何晓青等先后研制了肠杆菌科 4 属诊断噬菌体^[1]和志贺氏菌属诊断噬菌体^[2], 组成了可对肠杆菌科 5 个常见属(种)细菌作出诊断的噬菌体^[3]。我们应用这套噬菌体对来自腹泻病人和健康人群的 2280 株疑似志贺氏菌进行了检测, 同时进行了常规鉴定, 以评价这套噬菌体诊断志贺氏菌属细菌的实用性。

材料与方 法

(一) 材料

1. 菌株: 2280 株疑似志贺氏菌为山东省部分地(市)县卫生防疫站分离。其中 1822 株来自腹泻病人, 458 株来自健康人群。20 株侵袭性大肠杆菌(EIEC)分别来自中国药品生物制品检定所(O_{112ac}: K₆₅; O₂₅: K?), 江西省卫生防疫站(O₁₄₃: K?)和本室保存地方菌种。

2. 噬菌体: 肠杆菌科诊断噬菌体由江西省卫生防疫站制备, 在有效期内使用。

3. 诊断血清: 志贺氏菌属诊断血清(42 种/套)和 EIEC 诊断血清(11 种/套)均为兰州生物制品研究所制备, 在有效期内使用。

4. 培养基: SS 琼脂、普通琼脂、双糖铁琼脂和 MIU(动力、靛基质、尿素)为我站培养基室制备的半成品。各种生化培养基按文献 [3] 制备。

5. 试验动物: 健康豚鼠由本站动物室提供。

(二) 方法:

1. 菌株初筛: 菌株分离于 SS 平板, 37℃ 培养 18-20h。挑取氧化酶阴性菌落接种双糖铁斜面, 培养后做革兰氏染色, 若所测特性符合志贺氏菌属即做血清学分型。

2. 噬菌体裂解及生化特性的检测: 分型菌株按文献 [2] 做 Sh 噬菌体 (10^3 RTD 1RTD) 裂解试验, 不论裂解与否均作常规生化检测。Sh 裂解的菌株如生化特性与文献 [4, 5] 一致, 而且葡萄糖铵阴性, 再按文献 [2, 3] 测定裂解模式。Sh 不裂解或生化特性与文献 [4, 5] 不一致, 或裂解模式与文献 [2, 3] 不符的菌株做进一步鉴定, 必要时做 Sereny 试验。

结 果

(一) 初筛结果

2280 株供试菌均为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌, SS 琼脂上生长良好, 双糖铁反应为 H₂S 和乳糖阴性, 发酵葡萄糖产酸不产气, 符合志贺氏菌特性。

———
本文承蒙江西省卫生防疫站何晓青主任技师审阅, 谨此致谢。

(二) 血清学分型和 Sh 裂解

2280 株疑似菌可分别与志贺氏菌属 28 个型(亚型)的血清凝集。被 Sh10³RTD 裂解的有 2223 株, 同时被 1RTD 裂解的有 2216 株。

(三) 生化特性 (表 1, 2)

由表 1 可见, 57 株 Sh 不裂解的菌株均因生化特性不符而排除出志贺氏菌。

由表 2 看出, 8 株 Sh 裂解菌株也因生化不符被排除出志贺氏菌。其中 5 株(血清学疑似痢疾 I 型 2 株, 福氏 1b、2a 和 y 各 1 株)裂解模式与文献 [2, 3] 模式不符; 3 株疑似福氏 4a 虽与文献 [2, 3] 模式相同, 但 1RTD 不裂解。

除上述 65 株非志贺氏菌外, 其余 2215 株经生化特性检测确认为志贺氏菌。生化特性为: 氧化酶、硫化氢、VP、苯丙氨酸、尿素、赖氨酸、克氏柠檬酸盐、葡萄糖铵和动力均阴性。除 11 株福氏 6 型和 10 株鲍氏 14 型^[6]发酵葡萄糖产生少量气体, 193 株宋内氏志贺氏菌和 1 株鲍氏 9 型迟缓发酵乳糖外, 其它均不产气且乳糖阴性。仅宋内氏志贺氏菌有鸟氨酸和粘液酸阳性株, 福氏 4a 有醋酸钠阳性株, 胨基质因血清型不同而各异。Sh 裂解试验表明, 除 2 株福氏 1b 仅 10³RTD 裂解外, 其余 2212 株 10³RTD 和 1RTD 均裂解。

表 1 57 株 Sh 不裂解的非志贺氏菌生化特性

| 志贺氏菌分型血清凝集 | 株数 | 排除志贺氏菌的主要生化特性 | 结论 |
|----------------|----|---|-------------------------|
| A ₁ | 5 | 葡萄糖铵+ 醋酸钠+ E、E ₄ 裂解 | 大肠埃希氏菌低活性 |
| | 2 | 产气+ VP+ 柠檬酸盐+ 动力+ | 产气肠杆菌 |
| | 2 | 产气+ VP+ 柠檬酸盐+ 赖氨酸+ | 肺炎克雷伯氏菌 |
| A ₂ | 3 | 产气+ VP+ 柠檬酸盐+ 动力+ | 产气肠杆菌 |
| 1a | 6 | 葡萄糖铵+ 醋酸钠+ 赖氨酸+ E裂解 | 大肠埃希氏菌低活性 |
| | 6 | 产气+ 乳糖+ 动力+ 胨基质+ E、E ₄ 裂解 | 人肠埃希氏菌 |
| | 2 | 产气+ VP+ 柠檬酸盐+ 动力+ | 产气肠杆菌 |
| 2a | 3 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ | 产气肠杆菌 |
| | 4a | 1 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ Ent裂解 |
| | 8 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ 赖氨酸+ | 产气肠杆菌 |
| | 2 | 产气+ VP+ 动力+ 赖氨酸+ | 蜂房哈夫尼亚菌 |
| | 1 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ | 阴沟肠杆菌 |
| B ₆ | 5 | 产气+ 乳糖+ ³ 动力+ 胨基质+ E、E ₄ 裂解 | 大肠埃希氏菌 |
| | 5 | 产气+ 乳糖+ ³ 动力+ 胨基质+ E、E ₄ 裂解 | 大肠埃希氏菌 |
| X | 2 | 产气+ 乳糖+ ⁴ 动力+ 胨基质+ E、E ₄ 裂解 | 大肠埃希氏菌 |
| Y | 1 | 产气+ 乳糖+ ² 动力+ 胨基质+ E、E ₄ 裂解 | 大肠埃希氏菌 |
| C ₁ | 1 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ Ent裂解 | 阴沟肠杆菌 |
| C ₂ | 1 | 产气+ VP+ 动力+ 柠檬酸盐+ 赖氨酸+ | 产气肠杆菌 |
| C ₄ | 1 | 葡萄糖铵+ 醋酸钠+ E裂解 | 大肠埃希氏菌低活性 |

“+” 右上角阿拉伯数字表示阳性天数, 下同

表2 8株Sh裂解的非志贺氏菌的生化特性

| 志贺氏菌血清集 | 株数 | 葡萄糖 | 乳糖 | V P | 硫化氢 | 胺基质 | 苯丙氨酸 | 尿素 | 动力 | 糖氨酸 | 鸟氨酸 | 葡萄糖胺 | 醋酸钠 | 克氏柠檬酸盐 | 粘液酸 | 噬菌体裂解 | | | 结论 |
|----------------|----|-----|----|-----|-----|-----|------|----|----|-----|-----|------|-----|--------|-----|--------------------|---------|-------------------|-----------|
| | | | | | | | | | | | | | | | | 10 ⁹ Sh | 1RTD Sh | 其它 | |
| A ₁ | 2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | E, E ₄ | 大肠埃希氏菌低活性 |
| 1b | 1 | ⊕ | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | E | 大肠埃希氏菌 |
| 2a | 1 | ⊕ | + | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | + | + | - | Ent | 阴沟肠杆菌 |
| 4a* | 3 | ⊕ | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | E, E ₄ | 大肠埃希氏菌 |
| y | 1 | ⊕ | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | E | 大肠埃希氏菌 |

“⊕”为产酸产气 “*” 1株不产气、1株无动力

(四) 裂解模式的测定结果

1. 志贺氏菌测定: 由表3可见, 2215株志贺氏菌分属于7个裂解模式。仅模式3的3株鲍氏5型为文献[2, 3]所未列入, 经生化检

测其特性符合志贺氏菌属, 且Sereny试验阳性, 其余血清型裂解模式与文献[2, 3]一致。

2. 侵袭性大肠菌(EIEC)测定:

表3 2215株志贺氏菌28个血清型(亚型)的裂解模式

| 序号 | 血清型 | 株数 | 噬菌体裂解模式 | | | | | | | 序号 | 血清型 | 株数 | 噬菌体裂解模式 | | | | | | | |
|-----------------|----------------|-----|---------|---|----|---|----|----------------|----------------|-----------------|-----|----------------|---------|---|----|---|----|-----|-----|---|
| | | | 0-1 | C | Sh | E | CE | E-4 | Ent | | | | 0-1 | C | Sh | E | CE | E-4 | Ent | |
| 1 | 1a | 79 | - | - | + | + | + | + | - | 5 | 2b | 2 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 1b | 253 | - | - | + | + | - | - | - | | 3a | 36 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 2a | 648 | - | - | + | + | + | + | - | | 4a | 2 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 2b | 69 | - | - | + | + | + | + | - | | X | 1 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 3a | 487 | - | - | + | + | + | + | - | | Y | 1 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 3b | 18 | - | - | + | + | + | + | - | | D | 153 | - | - | + | + | - | + | - | |
| | 4a | 49 | - | - | + | + | + | + | - | | 6 | A ₃ | 2 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 4b | 2 | - | - | + | + | - | + | - | | | A ₄ | 2 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 5a | 15 | - | - | + | + | + | + | - | | | B ₆ | 46 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 5b | 37 | - | - | + | + | + | + | - | | | C ₁ | 1 | - | - | + | - | - | - | - |
| X | 27 | - | - | + | + | + | + | - | C ₂ | 1 | | - | - | + | - | - | - | - | | |
| Y | 53 | - | - | + | + | + | + | - | C ₄ | 1 | | - | - | + | - | - | - | - | | |
| 2 | A ₂ | 29 | - | - | + | + | + | - | 7 | C ₁₀ | | 3 | - | - | + | - | - | - | - | |
| | 1a | 2 | - | - | + | + | - | - | | C ₁₄ | | 10 | - | - | + | - | - | - | - | |
| | 1b | 3 | - | - | + | + | - | - | | C ₁₈ | | 3 | - | - | + | - | - | - | - | |
| | 4a | 3 | - | - | + | + | - | - | | C ₉ | | 1 | - | - | + | - | + | - | - | |
| C ₅ | 2 | - | - | + | + | + | - | A ₁ | | 10 | - | - | + | - | - | + | - | | | |
| C ₁₆ | 4 | - | - | + | + | + | - | | | 4a | 2 | - | - | + | + | - | - | - | | |
| 3 | A ₂ | 9 | - | - | + | + | - | | | - | D | 135 | - | - | + | + | - | - | - | |
| | 4 | 1b | 5 | - | - | + | + | - | | + | | - | - | | | | | | | |
| 2a | | 2 | - | - | + | + | - | + | | C ₅ | | 3 | - | - | + | + | - | - | - | |
| | | | | | | | | | | C ₁₆ | 3 | - | - | + | + | - | - | - | | |

“0-1”沙门氏菌噬菌体 “C”弗劳地柠檬酸杆菌噬菌体φ1和φ1组成 “Sh”志贺氏菌噬菌体
 “E”由大肠杆菌噬菌体E-1和E-2组成 “CE”由弗劳地柠檬酸杆菌噬菌体φ1和大肠杆菌噬菌体E-3组成
 “E-4”大肠杆菌噬菌体 “Ent”阴沟杆菌噬菌体 “+”融合性裂解, “-”不裂解。

表4 20株侵袭性大肠菌和相关抗原志贺氏菌的肠杆菌科诊断噬菌体裂解结果

| 侵袭性 大肠菌 血清型 | 株 数 | Sh 裂解 | | 其它 噬菌体 裂解 | 相关抗原 的志贺氏 菌血清型 | Sh 裂解 | | 其它 噬菌体 裂解 |
|--------------------------|--------|---------------------|------|-----------------|----------------------|---------------------|------|-----------------|
| | | 10 ³ RTD | 1RTD | | | 10 ³ RTD | 1RTD | |
| O28 _{ac} : K>3 | 8 | + | + | E | C ₁₃ | + | + | O-1 |
| O29: k? | 1 | + | - | E | A ₁₁ | + | + | - |
| O112 _{ac} : K66 | 1 | + | - | - | A ₂ | + | + | E (CE) |
| O121: H- | 1 | + | + | E | A ₇ | + | + | - |
| O124: K72 | 3 | + | + | E | A ₃ | + | + | - |
| | | | | | C ₁₇ | + | + | E (CE) |
| O143: K? | 1 | + | - | - | C ₃ | + | + | - |
| O144: K? | 1 | - | - | E (CE) | A ₁₀ | + | + | - |
| O152: K? | 1 | + | + | E | A ₁₂ | + | + | - |
| O164: K? | 3 | + | - | E | A ₃ | + | + | - |

由表4可见, 20株EIEC均可用Sh10³RTD、1RTD和裂解模式与抗原相关的志贺氏菌区分。

讨 论

1. Sh噬菌体具有高度属的特异性, 10³RTD对属内裂解率为100%, 1RTD为99.9%。65株分型血清凝集的非志贺氏菌中被10³RTD裂解的8株, 占12.3%, 同时被1RTD裂解的有3株, 占4.6%。

2. 2215株确认为志贺氏菌的裂解模式测定表明, 仅模式3中的3株鲍氏5型为文献^[2,3]所未列入。建议将此血清型加入该模式中。余者与文献^[2,3]的裂解模式完全一致。此结果表明, 现有的裂解模式适用于我国志贺氏菌属流行菌株的测定。

3. 8株Sh裂解、血清凝集的非志贺氏菌及20株(9个血清型)具有志贺氏菌相关抗原的EIEC均可用裂解模式或Sh10³RTD或1RTD与志贺氏菌鉴别。

4. 本试验结果表明, 在志贺氏菌属细菌的鉴定中, 仅凭双糖铁或三糖铁反应结果即做血清学分型, 对腹泻病人菌株的误诊率为1%左

右, 对健康人群菌株高达10%。

根据上述结果, 建议在志贺氏菌的常规鉴定中, 用肠杆菌科诊断噬菌体代替繁琐复杂的生化试验, 通常在48h左右就可得到准确结果。兹推荐如下试验程序。

(1) 从鉴别培养基上挑取氧化酶阴性的可疑菌落, 接种双糖和半固体或MIU各一支, 37℃培养18—20h, 观察结果并做革兰氏染色。

(2) 如所检特性符合志贺氏菌, 按文献^[2,3]作肠杆菌科诊断噬菌体裂解试验, 37℃培养6h观察结果。

(3) 裂解结果的判定及血清学检查: ①凡Sh10³RTD不裂解者, 排除出志贺氏菌; ②Sh10³RTD和1RTD均裂解, 其裂解模式与表5某模式相同时, 可按预测菌型作血清学检查; ③已知痢疾1型、福氏1b、鲍氏13和鲍氏16型有Sh1RTD不裂解株, 但裂解模式不变, 故仍按表5预测菌型做血清学检查; ④A群的3—12型和C群的1—18型国内检出率极低, 有些至今尚未检出。故测试菌较少, 实际工作中可能出现与预测菌型分型血清均不凝集的菌株。此时应按常规作血清学检查, 并补作系统生化试验。

表5 志贺氏菌菌型预测参考反应表

| 序号 | 噬菌体裂解模式 | | | | | | | 菌型预测 |
|----|---------|---|-----------------|----|----|-----|-----|--|
| | O-1 | C | Sh ^② | E | CE | E-4 | Ent | |
| 1 | - | - | CL ^① | CL | CL | CL | - | 福氏1-5, (鲍氏11) |
| 2 | - | - | CL | CL | CL | - | - | 福氏1, 4, 痢疾2, 鲍氏5, 7, 11, 16, 17, (宋内氏1) |
| 3 | - | - | CL | CL | - | - | - | 宋内氏1, 痢疾2, 福氏4, 鲍氏5, 16 |
| 4 | - | - | CL | CL | - | CL | - | 宋内氏I, 福氏3 |
| 5 | - | - | CL | - | - | - | - | 福氏6, 鲍氏1-4, 偶数型6-18 (16除外), 痢疾3-12 |
| 6 | - | - | CL | - | CL | - | - | 鲍氏9, 15 |
| 7 | - | - | CL | - | - | CL | - | 痢疾1, (宋内氏II) |
| 8 | CL | - | CL | - | - | - | - | 鲍氏13 |

①“CL”为融合性裂解 ②包括10³RTD和1RTD两种浓度;已知痢疾I型、福氏1b和鲍氏13型及16型有1RTD不裂解株。“-”为不裂解

参 考 文 献

- 何晓青等:微生物学学报, 24(3): 282, 1984.
- 何晓青等:中华微生物学和免疫学杂志, 8(2): 96, 1988.
- 何晓青等:卫生防疫细菌检验, 江西新华出版社, PP. 650, 571, 714, 1989.
- 郝士海等译:肠杆菌科鉴定(第三版), 卫生部药品生物制品鉴定所, 北京, P. 102, 1987.
- W H Ewing et al.: Identification of Enterobacteriaceae 4th New York, P. 135, 1986.
- 李景学等:微生物学通报, 18(2): 84, 1991.

(1992-12-14 收稿)

EVALUATION ON DETECTION OF SHIGELLA CULTURES WITH THE DIAGNOSTIC TYPING PHAGE SET FOR ENTEROBACTERIACEAE

Li Jingxue Zhou Guoqing Wen Xianqin Yu Qinwen Sun Qihua Cui Shuyu
(Shandong Hygienic and Anti-epidemic Station, Jinan 250014)

In this paper, 2280 strains of suspicious *Shigella* c culture were detected by the diagnostic typing phage set for Enterobacteriaceae, the routine identification of them were carried out at the same time. The results showed that 100% of *shigella* cultures were lysed with 10³RTD and 99.9% lysed with 1RTD of phage Sh. 12.3% of 65 non-*shigella* cultures agglutinating with typing serum of *shigella* was lysed with 10³RTD, 4.6% lysed with 1RTD of phage Sh. The determination of lytic-pattern of 2215 *shigella* culture indicated that only 3 strains of Boyd 5 of lytic-pattern 3 were not reported in literature, the rest strains were consistent to former studies. The non-*shigella* cultures lysed by Sh 10³RTD could be excluded with 1RTD and its lytic-pattern. 20 strains of Enteroinvasive *Escherichia coli* possessing *shigella*-related antigens could be differentiated by Sh 10³RTD, 1RTD and its lytic-pattern.

Key words Lytic patterns of phage; Enterobacteriaceae; *Shigella*; Enteroinvasive *Escherichia coli*