

## 噬菌体对产肠毒素大肠杆菌菌型的鉴别

戈宝榛 朱素娟 王家驹 司穉东

(中国科学院上海植物生理研究所噬菌体实验室, 上海)

### 提 要

从上海近郊采集的82份污水中, 分离到产肠毒素(LT、ST、LT+ST)大肠杆菌噬菌体46株, 根据噬菌体的特性, 选择19株, 试用为产肠毒素大肠杆菌菌型的鉴别, 对世界卫生组织、卫生部药品生物制品检定所提供的产肠毒素大肠杆菌75株和福建省卫生防疫站提供的产肠毒素大肠杆菌51株进行了型的分析, 总分型率达98.41%。并研究排除分型试验中可能出现的假阳性结果。

1956年De等<sup>[1]</sup>从有霍乱样症状的患者中分离到大肠杆菌, 发现其培养液注入兔结肠段能产生显著液体积聚现象。其后对此毒素的鉴定进行了研究<sup>[2]</sup>, 但对流行病学的研究如传染源的追踪。流行的菌型及其变迁等尚缺乏有效的手段。我们根据噬菌体对细菌的特异性, 分离选择了一组噬菌体, 建立了产肠毒素大肠杆菌噬菌体分型方案, 对收集的126株产肠毒素的大肠杆菌进行了分型。

### 材 料 与 方 法

**一、培养基:** (一) LB培养基: 胰胨1%, 酵母浸膏0.5%, 氯化钠0.5%, 以2N氢氧化钠调至pH7.4。

(二) 豚肉膏汤培养基: 蛋白胨1%, 牛肉膏0.5%, 氯化钠0.5%, pH7.2。

(三) 豚肉膏汤琼脂培养基: (二)中加入琼脂1.5%为固体培养基, 加琼脂0.5%为半固体培养基。

**二、菌株:** (一)由世界卫生组织(上海市卫生防疫站保存)与卫生部药品生物制品检定所提供产肠毒素(LT、ST及LT+ST)大肠杆菌75株。

(二)由福建省卫生防疫站提供产肠毒素(LT、ST及LT+ST)大肠杆菌51株。以上共126株。

**三、噬菌体的分离:** 30毫升污水样品中, 加入3毫升浓缩10倍的豚肉膏培养基, 再加入1毫升宿主菌培养物, 于37℃振荡培养3~4小时, 然后取10毫升培养物离心除去细菌, 上清液再用0.45μ微孔滤膜过滤, 滤液点滴于铺有指示菌的琼脂平板上, 次日观察是否有噬斑出现, 以此证明滤液中是否有噬菌体存在。

每株噬菌体需经3次以上单噬斑分离纯化, 然后增殖备用。

**四、分型噬菌体常规试验稀释度(Routine Test Dilution, RTD)的测**

本文于1987年5月30日收到。

**定:** 接种宿主菌于LB培养液, 37℃振荡培养3~4小时, 取1毫升接种物布满琼脂平板表面并吸出多余菌液, 待平板表面干后, 于表面滴加一系列以豚肉膏汤10倍稀释的噬菌体1滴, 干后置37℃培养。次日观察结果, 以几乎近于呈融汇性裂解结果的稀释度为该噬菌体的RTD。

**五、菌体的噬菌体分型方法:** 用琼脂平板点滴法<sup>[4]</sup>, 在布有待分型菌株的琼脂平板上滴加常规试验稀释(RTD)的噬菌体1滴(0.01毫升)。

#### 六、记录标准:

卅: 滴加噬菌体处呈融汇性裂解;

卌: 滴加噬菌体处呈几乎接近于融汇性裂解, 即噬菌体为RTD时的结果;

卍: 噬斑多, 呈半融汇性, 低于卌;

卍: 20—50个噬斑;

+: 5个噬斑以上;

±: 4个噬斑以下, 并记录噬斑数, 如3个噬斑记为±<sub>3</sub>;

-: 无噬斑, 即阴性结果

( ): 经证明为抑菌, 再经任何稀释也无噬斑出现。

“+”以上列为分型的阳性结果。

**七、菌株噬菌体型的命名:** 参照金葡菌噬菌体分型命名方案, 略加改动, 以呈“+”反应的噬菌体名称作为菌株噬菌体型的名称, 两个噬菌体以上时, 中间隔以斜线命名。如有“±”反应, 在最末斜线之后括弧内记±及噬菌体名称。

## 结果与讨论

### 一、分型噬菌体的分离

从上海近郊采集82份水样, 按所述方法分离到产肠毒素大肠杆菌噬菌体46株, 根据对菌株的特异性、裂解稳定性、宿主范围、噬斑透明度、大小、增殖培养等特性, 选择19株噬菌体, 组成一套分型噬菌体, 见表1, 经增殖RTD都在 $10^{-4}$ 以上。

### 二、产肠毒素大肠杆菌的噬菌体分型

噬菌体对75株由世界卫生组织与卫生部药品生物制品检定所提供的产肠毒素(LT、ST及LT+ST)的大肠杆菌菌株进行了分型, 菌株可分为48个型别, 分型率达98.66%。对福建省卫生防疫站提供的产肠毒素大肠杆菌51株, 可分为32个型, 分型率达98.39%。126株菌共可分为72个型别, 其中两个菌株以上的型别见表2。

### 三、分型噬菌体溶原性宿主菌产生噬菌体所造成假阳性结果的排除

溶原性在细菌中普遍存在, 如作为分型噬菌体的增殖宿主是溶原性菌, 则在增殖分型噬菌体时必定混有宿主菌自发产生温和性噬菌体。如不排除此等噬菌体所致结果, 必将影响分型结果而得出错误结论。所以在确定噬菌体RTD值时应排除由此产生的噬斑。我们对19个分型噬菌体的18株宿主菌用丝裂霉素C诱导, 诱导液以87株菌为指示菌检测,

表1 分型噬菌体的特性

Table 1 The characteristics of the typing phages

噬菌体 Phage	增殖菌株 Host Strain	RTD Routine Test Dilution	噬斑特性 Characteristics of phage plaque	
			噬斑大小 (mm) Size	透明度 Transparence
E1	E1	10 <sup>-5</sup>	1-2	透明有晕环
E2	E2	10 <sup>-5</sup>	1-2	透明
E3	E3	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E4	E4	10 <sup>-5</sup>	3-4	透明
E5	E5	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E6	E6	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E7	E7	10 <sup>-4</sup>	0.8	透明
E8	E2	10 <sup>-4</sup>	2-3	透明
E9	E9	10 <sup>-4</sup>	2-3	透明有晕环
E10	E10	10 <sup>-5</sup>	0.8	透明
E11	E11	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E12	E12	10 <sup>-5</sup>	2-3	透明有晕环
E13	E13	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E14	E14	10 <sup>-5</sup>	1-2	透明
E15	E15	10 <sup>-5</sup>	1-2	透明
E16	E16	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E17	E17	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E18	E18	10 <sup>-4</sup>	1-2	透明
E19	E19	10 <sup>-5</sup>	3-4	透明

表2 产肠毒素大肠杆菌噬菌体分型

Table 2 Typing phage of enterotoxigenic *E. coli*

菌株的噬菌体型 Phage patterns of strains	产 肠 毒 素 Enterotoxin			总计 Total
	LT	ST	LT-ST	
1/3/16	2	3		5
1/5/17/18	1	1	1	3
1/6/10/16	4	1		5
3	3			3
3/17/18	1	2	1	4
5	1	1		2
5/17/18		12	2	22
5/18	1	1		2
14/15/16	2		1	3
15/16/18		2		2
16	2			2
17/18	1		3	4
18			2	2

未检出有噬斑。用同样方法, 对72株产肠毒素大肠杆菌诱导液互做交叉裂解试验, 发现菌株ST185为溶原性菌, 其自发和诱导产生噬菌体的量如表3。

表3 测定菌株ST185自发和诱导噬菌体释放  
Table 3 Determining phages released from spontaneity and induction of enterotoxigenic E.coli strain ST 185

噬菌体 释放 Phages released	稀释	Dilution of phage lysate			
		0	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
ST 185自发 Spontaneity	—	—	—	—	—
ST 185诱导 Induction	+++	++	+	—	—

因此将噬菌体原液稀释至 $10^{-3}$ 时不能再检出噬斑, 噬菌体RTD在 $10^{-3}$ 以上时, 将不会因此等噬菌体造成假阳性结果。

#### 四、排除噬菌体“抑菌现象”所致假阳性结果

高浓度噬菌体对产肠毒素大肠杆菌也可发生“抑菌现象”, 这种现象在琼脂平板上所得结果与噬菌体的增殖性裂解几乎不能区别, 而误认为阳性结果, 这是由于大量噬菌体吸附时对菌细胞的直接致死所致, 或称“外因裂解”。噬菌体经适当稀释后这种现象即消失, 而且不出现噬斑。为了避免出现这种结果, 分型时使用噬菌体的RTD应能排除此种现象。经检查高浓度的分型噬菌体中, 多数均可对不同菌株有“抑菌现象”, 见表4。稀释 $10^{-1}$ , 19个分型噬菌体有10个在不同菌上出现“抑菌现象”, 稀释 $10^{-2}$ 则还有5个噬菌体出现“抑菌现象”, 但稀释到 $10^{-3}$ 时这种现象都可消失, 并且不出现噬斑。当然噬菌体效价越高, 出现“抑菌现象”稀释的程度也越高。我们选出的19株噬菌体的RTD均高于出现这种现象 $10^{-2}$ — $10^{-3}$ 倍, 因此确定RTD值为 $10^{-4}$ 或 $10^{-5}$ 时, 才可排除“抑菌现象”。

#### 五、排除噬菌体可能发生宿主范围突变体致成的假阳性结果

噬菌体可能发生宿主范围突变而影响其分型的结果。根据测定每个RTD噬菌体0.01

表4 分型噬菌体对126株菌呈抑菌作用的菌数  
Table 4 Inhibition of 126 strain by typing phage

噬菌体 Phage	稀释 Dilution	抑菌的菌数 Number of inhibition strains									
		E3	E5	E7	E10	E13	E14	E15	E16	E17	E19
10 <sup>-1</sup>	5	8	7	2	11	4	3	13	5	2	
	10 <sup>-2</sup>	0	2	1	0	7	0	0	3	2	0
10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

毫升噬斑数, 除1株(E<sub>3</sub>)为 $2.5 \times 10^4$ 外, 其余均为 $7.5 \times 10^3$ 以下, 噬菌体宿主范围突变的频率约为 $10^{-4}$ 至 $10^{-5}$  [5], 因此如以5个以上噬斑为分型的依据, 应不会出现假阳

性结果。

### 参 考 文 献

- [1] De S.N. et al., 1956, *J. Pathol. Bacteriol.* 72: 201.  
[2] Sack R.B. et al., 1971, *J. Infect Dis.* 123: 378.  
[3] Finkelstein R.A. et al., 1983, *J. Clin. Microbiol.* 18: 1123.  
[4] 司榭东等, 1965, 微生物学报 11(4): 586.  
[5] 司榭东等主译, 1979, 噬菌体, P.215 (Adams M.H. 1955 Bacteriophage Interscience publishers, INC, New York)

## Bacteriophage Typing of Enterotoxigenic *E. coli*

Ge Bao-zhen Zhu Su-juan Wang Jia-xun Shi Zhi-dong

(Laboratory of Bacteriophage, Shanghai Institute of Plant  
Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

This paper reports that 46 phage strains lysing enterotoxigenic (LT, ST, LT-ST) *E. coli* were isolated from 82 sewage samples collected from Shanghai suburb. 19 phages of them were selected and used to type enterotoxigenic *E. coli* strains, 75 from WHO and National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Product and 51 from Fujian Provincial Health and Antiepidemic Station. It was found that they can be typed into 48 (98.66%) and 32 (98.39%) patterns respectively. Routine test dilution of the typing phage was used in order to exclude the possibilities of false appearance of nonspecificity lysis, caused by contamination of temperate phages of lysogenic host, inhibition or lysis from without of high-titer preparation and host-range mutation.