

同一血清型侵袭性大肠杆菌引起两次食物中毒的噬菌体分型研究探讨

中国药品生物制品检定所 杨正时 许华玉 指导 晏 质

提要 作者用大肠杆菌K₁₂株检查发现1984年7~9月在北京引起二次食物中毒的侵袭性大肠杆菌血清型O₂₈ac:K₇₃(B):H-菌株均具有产生相同大肠杆菌素的能力,对8株从北京地区污水中分离的噬菌体的敏感性是一致的,而不同于同一血清型的EIEC保存株与其它菌株,说明这二次食物中毒是由相同噬菌体型的O₂₈ac菌株所引起的,也证明了当年北京城西地区存在着EIEC O₂₈ac的局部爆发流行。本文尚详细讨论了由大肠杆菌素和噬菌体形成的噬菌斑的鉴别方法。

关键词 侵袭性大肠杆菌 噬菌体

1984年7~9月,在北京市西郊的二个单位相继发生了二次规模较大的食物中毒,经作者确定均由侵袭性大肠杆菌O₂₈ac:K₇₃(B):H-所致^[1,2]。从发生时间与地点的流行病学因素分析,这二次食物中毒似乎有一定联系,虽然这二次中毒的病原菌在生物化学、血清学及其它特征上均极为相似,但尚不足以说明这两次流行间的关系。为此,本文应用噬菌体分析技术对引起这二次食物中毒的菌株进行了溶源性检查及对噬菌体的敏感性测定,以分析并确证该年夏季在北京西郊地区存在着EIEC, O₂₈ac:K₇₃: (B):H-菌株局部流行的可能性。

材料和方法

一、菌株:从某小学食物中毒中检出112株,从北京某部食物中毒中检出2株,共计114株菌,除一株是从食物(茶叶鸡蛋)中分离的以外,其余113株是从患者(儿童,成人)中分离的,这些菌株均经生化和血清学鉴定;5株库存的EIEC“O”抗原标准株,经检查已丧失侵袭力;另有10株不同血清型的普通大肠杆菌,K₁₂株用于检查与增殖噬菌体。

二、噬菌体:在北京近郊河流、沟渠、池塘中无菌吸取污水样品,以大肠杆菌K₁₂株为

增殖菌,10毫升肉汤加样品1毫升,再加适宜的K₁₂株新鲜肉汤培养物,37℃孵育24小时,取培养物2~3毫升,加氯仿处理,离心沉淀,取上清滴于K₁₂株和各被试菌株菌液制作的平皿上,必要时稀释后滴平皿,观察溶菌情况。在22处取污水分离出对大肠杆菌K₁₂裂解的噬菌体14株,用常规平板法进行噬菌体裂解试验。

三、溶源性检查:在营养肉汤中加入丝裂霉素C,使其最终浓度为0.1微克/毫升,接种被试菌株,37℃培养过夜,加入氯仿杀死,以3000转/分离心沉淀20分钟,取上清滴于K₁₂菌株和由各被试菌株菌液制备的平皿上,观察溶菌情况。为了分析在K₁₂敏感株上出现的融合性斑的性质,遂进行以下三项试验,观察噬斑。

1. 稀释成斑试验:把滴在K₁₂株上的O₂₈ac株菌液的上清,经10、100倍稀释后再次滴皿,37℃培育2、4、6、12小时后分别观察。

2. 挖斑增殖:把在K₁₂株上出现的融合性噬斑,用白金耳把斑取出,放在适量的肉汤管中,37℃培育4~6小时后,加氯仿,再次滴皿观察。

3. 交叉溶菌:被试的菌株用氯仿处理的每一株上清液分别滴加于所有菌液制备的平板上检查噬斑。

结 果

一、溶菌蚀斑及其鉴定：114株 O_{28ac} 菌株在经丝裂霉素C诱导、用氯仿处理，其上清滴于混有K₁₂菌液的平皿上培育3~4小时后，均见明显的融合性斑，但其性状既不像裂解性噬菌体那样透明，又不同于温和性噬菌体所致毛玻璃样裂解。经稀释后不同时间观察，滴细菌原液的噬菌斑消失，也未见散在性噬斑，挖斑增殖试验阴性，也未见交叉溶菌，因此说明

被试菌株在K₁₂株平皿上形成的噬斑是一种非增殖性裂解的溶菌现象。

二、噬菌体对食物中毒株及有关大肠杆菌的裂解：从水样中分离出14株对K₁₂菌裂解的噬菌体，其中选出8株进行增殖，提高效价到10⁻⁴以上，然后对食物中毒O_{28ac}株和其它血清型的侵袭性，非侵袭性大肠杆菌进行宿主范围的测定。从附表可见，7株噬菌体 Φ三、Φ₁、Φ₃、Φ₄、Φ₉、Φ₁₀、Φ₁₁ 对其它类型的大肠杆菌均有不同程度的裂解，而对北京地区二次食

附表

8株噬菌体对中毒株与其它菌株的裂解

菌株类别	血 清 型	株数	噬 菌 体							
			Φ二	Φ三	Φ ₁	Φ ₃	Φ ₄	Φ ₉	Φ ₁₀	Φ ₁₁
某小学中毒株	O28ac : K73(B) : H-	10	+	-	-	-	-	-	-	-
某部中毒株	O28ac : K75(B) : H-	2	+	-	-	-	-	-	-	-
EIEC (国外株)	O28ac : K73(B) : H-	1	+	-	-	-	-	-	-	+
	O28ab : H-	1	+	+	-	-	-	-	-	+
	O29 : H10	1	+	+	-	+	+	+	-	+
	O112ac : K66(B) : H-	1	-	-	-	+	+	+	-	+
	O124 : K72(B) : H30	1	+	+	+	+	+	+	+	+
非EIEC (国外株)	O1 : K1(L) : H7	1	+	+	-	+	+	+	-	+
	O6 : K2ac : H1	1	+	-	-	+	+	+	+	-
	O24 : H-	1	-	-	-	-	-	-	+	-
	O32 : H19	1	-	-	-	+	-	+	+	+
	O35 : H10	1	-	-	+	+	+	+	-	+
	O40 : H4	1	+	+	+	+	+	+	-	+
	O55 : K59(B) : H-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	O63 : H-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	O76 : H8	1	-	-	-	+	+	+	-	+
	O84 : H21	1	+	+	+	+	+	+	-	+

物中毒菌株均不裂解；Φ二噬菌体在对其它大肠杆菌有不同裂解的同时，却能全部裂解二次食物中毒的O_{28ac}株。

讨 论

侵袭性大肠杆菌是一群和痢疾杆菌抗原有密切关系或与志贺氏菌有遗传学关系的大肠杆菌。生物学性状酷似痢疾杆菌，能侵入上皮细胞，能引起豚鼠角膜结膜炎，临床实验室中有时很难与痢疾杆菌相鉴别。由于彼此间生化反

应的相似性，在追踪传染源，阐明传播途径等方面，有时感到十分困难。因此作者在本文中利用噬菌体裂解谱分析最近北京地区发生的由侵袭性大肠杆菌O_{28ac}菌株所引起的二次食物中毒间的内在联系，获得了较为满意的结果。

大肠杆菌K₁₂菌株对大肠杆菌噬菌体和大肠杆菌素都十分敏感，这二次食物中毒病原菌O_{28ac}在经丝裂霉素C诱导后，其培养液上清对K₁₂菌株均出现溶菌斑，作者用了三种方法鉴定噬菌斑的性质。细菌素存在于菌液中时，在

适当稀释后丧失抑菌能力,溶菌斑也随着消失。高浓度的噬菌体悬液,滴于K₁₂株平皿上时,可形成完全透明的融合性噬斑,在稀释到适当浓度时可形成散在的单个噬菌体噬斑。在挖斑增殖时,由于细菌素不具有增殖能力,因此,当挖出的溶菌斑置于肉汤中时,不但没有增加其活性,反而因肉汤稀释而变弱或消失,与此相反,噬菌体具有增殖能力;在将斑块琼脂置于肉汤中时,把部分宿主菌也带入肉汤中,引起噬菌体的大量增殖,从而提高了效价。因此上述二个试验是鉴别溶菌斑的简易有效的方法。本文中的O_{28ac}株对K₁₂的溶菌斑是非增殖性裂解,是由于该菌释放大肠杆菌素所引起的,而不是释放噬菌体。因此,这些菌株均具有大肠杆菌素原性,而不是溶源性菌株。O_{28ac}菌株间无交叉溶菌现象,说明这些菌株具有产生相同大肠杆菌素的能力。

这二次食物中毒的代表性菌株对从污水中分离的8株噬菌体具有相同的敏感谱,均对Φ二噬菌体敏感,而对其它七株噬菌体不敏感,对其它菌株即使同一血清型的库存O_{28ac}株也不相同,说明Φ二及其它七株噬菌体对这二次食物中毒株的裂解特性是相同的,具有特异性。因此可以说明在该年7~9月在北京城西地区所发生的二次食物中毒是由同一噬菌体型的O_{28ac}菌株所引起的。在该地区存在局部爆发流行,Φ二噬菌体可以作为追踪传染源,阐明传播途径的重要工具。

A Study on Phage Analysis of two Episodes of food Poisoning Caused by the same Serotype of Enteroinvasive Escherichia Coli Yang Zhengshi, et al., National institute for the control of pharmaceutical and biological products, Beijing

The strains of EIEC serotype O_{28ac}:K73 (B):H—were isolated from two episodes of food poisoning in Beijing during July to September in 1984. All strains were examined by E.coli K₁₂ and found that they possessed the ability to produce the same colicin and same phage sensitivity pattern to eight phages isolated from contaminated water in Beijing area. These characteristics were different from reserved strains O_{28ac} and other strains of E.coli. It indicated that two episodes were caused by the same phage type of O_{28ac}:K73 (B):H—and proved the local outbreak was caused by same strain in western area of Beijing. The authors discussed in detail. The differentiation methods for plaque formation produced by colicin and phage

Key words Enteroinvasive escherichia coli Phage

参考文献

1. 杨正时, 等. 国内首先发现与确诊的爆发性食物中毒病原菌——侵袭性大肠杆菌血清型O_{28ac}:K73 (B):H— . 北京医学 1986; 8 (5):257.
2. 张绪团, 等. 侵袭性大肠菌引起食物中毒调查报告. 微生物学通报 1985; 12 (6):266.

欢迎订购立克次体、衣原体、螺旋体专辑

《中华流行病学杂志》1989年第10卷特刊3号收录了近年来在我国新发现的立克次体病、性病沙眼衣原体, 畜禽鹦鹉热衣原体、莱姆病、钩体病和鸡疏螺旋体病等约60万字, 现已出版。售价6元/册 (含邮费), 欲购者请一律邮汇; 102206北京昌平流字五号立克次氏体室国平平收, 收款后即寄。