

## 利用噬菌体快速鉴定沙门氏菌的研究\*

姜 琴<sup>1</sup> 蒋鲁岩<sup>2</sup> 黄克和<sup>1\*\*</sup>

(南京农业大学动物医学院 南京 210095) (江苏省出入境检验检疫局 南京 210000)

**摘要** 用肠杆菌科 7 个组合噬菌体对培养不同时间的 60 株肠杆菌科细菌进行平板法和液体法裂解,观察其裂解效果,并与生化鉴定进行比较。结果表明:平板法裂解培养 2h、6h、10h 和  $\geq 18$ h 的沙门氏菌(生化鉴定为 45 株)裂解率分别为 91.1%、93.3%、97.8% 和 88.9%,其余菌株几乎不被沙门氏菌特异噬菌体裂解,液体法裂解培养 10h 的菌液效果更佳。对 150 份食品样品检测也获得相似结果。说明肠杆菌科 7 个组合噬菌体对培养 10h 的沙门氏菌有较高的敏感性和特异性,这对实现沙门氏菌实时、快速而准确的检测有重要意义。

**关键词** 沙门氏菌 噬菌体 鉴定

中图分类号:R446.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1138-04

## Study on the Rapid Identification of *Salmonella* by Using Bacteriophage\*

JIANG Qin<sup>1</sup> JIANG Lu-Yan<sup>2</sup> HUANG Ke-He<sup>1\*\*</sup>

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210000)

**Abstract** To study the incidence rate of *Salmonella*, seven strains bacteria-specific phages as a group were used for identification of *Salmonella* species. All of the 60 bacteria (for test) were inoculated in Luria Bertani (LB) broth, cultivated in 37°C for 2 hours, 6 hours, 10 hours and  $\geq 18$  hours respectively, then tested on agar plate and in LB broth, and made micro-biochemical identification through automatic biochemistry analyzer, to confer the most suitable inoculated hours for test bacteria. The result showed that, tested on agar plate, the positive rates of *Salmonella* cultivated for 2h, 6h, 10h and  $\geq 18$ h were 91.1%, 93.3%, 97.8% and 88.9% respectively; while tested in LB broth, a reasonable result was showed in the 10h-inoculated tested bacteria. It was resemble to test with food samples bought from some markets in Nanjing. It provided theoretical evidence for performing detection *Salmonella* species in food with real time, speed, selective and specific.

**Key words**: *Salmonella*, Phages, Identification

沙门氏菌(*Salmonella*)属是一群形态和培养特性都类似的肠杆菌科中的一个属,也是肠杆菌科中最重要的病原菌属,由沙门氏菌引起的食物中毒病例在食物中毒中位居前列<sup>[1,2]</sup>。因此沙门氏菌为食品中致病菌检测的一项重要指标,在公共和食品卫生、畜牧兽医和口岸检疫中有重要的意义。目前,国内外普遍采用传统培养方法对沙门氏菌进行检验,例如改良的快速显色培养基法、单一与复合 PCR 技术、探针杂交技术和生物芯片技术等<sup>[3-7]</sup>。但这些方法都有不同程度的缺陷,如检测时间长,仪器投入资金大,耗材贵,操作复杂以及检测率低和难有效

区分死活细胞等。

噬菌体检测细菌技术是一种新兴而有发展潜力的检测方法,它因速度快、检测效率高、方法简单、仪器设备要求低、成本低廉,且能严格区分死活细胞等优点而倍受青睐<sup>[8]</sup>。近年来,人们在利用噬菌体检测细菌方面做了广泛的研究,如利用直接裂解检测噬菌斑,荧光检测以及噬菌体展示技术的方法对大肠杆菌 O<sub>157</sub>、传统肠道菌志贺氏菌等的检测<sup>[8-11]</sup>。然而,关于试验中待试菌培养时间的长短方面的研究尚少见报道。本试验用 7 种噬菌体组合对 60 株肠杆菌科细菌进行平板法和液体法裂解,分析组合

\* 国家自然科学基金项目(No. 30371060),江苏省出入境检验检疫局(No. 2004KJ02)

\*\* 通讯作者 Tel: 025-84395507, E-mail: khhuang@njau.edu.cn

收稿日期:2007-04-02,修回日期:2007-07-04

噬菌体对培养不同时间的沙门氏菌的特异性及敏感性,模拟裂解试验中待试菌的最佳培养时间,为实现实时、快速而准确的检测沙门氏菌提供一定的理论参考。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:** 试验用细菌共 60 株,其中大肠杆菌(ATCC25922)、鼠伤寒沙门氏菌(50013)、福氏志贺氏菌(51302)、普通变形杆菌和奇异变形杆菌各 1 株,共 5 株由江苏省疾病预防控制中心提供;其余菌株由江苏省出入境检验检疫局食品微生物实验室提供。

**1.1.2 培养基:** 分离培养基为科玛嘉沙门氏菌显色培养基(CHR Magar *Salmonella*)、科玛嘉大肠杆菌显色培养基(CHR Magar *E. coli*)、购买于博赛科玛嘉公司和 SS 培养基;裂解培养基为肉汤培养基、1.5% 和 0.35%~0.40% 的琼脂培养基及蛋白胨水。

**1.1.3 噬菌体:** 噬菌体由广州虎克生物技术有限公司提供,均在有效期内使用。

O-1: 沙门氏菌属噬菌体;

C: 枸橼酸杆菌噬菌体;

Sh: 志贺氏菌噬菌体;

E: 艾希氏菌噬菌体(E-1 和 E-2 混合);

CE: 枸橼酸杆菌噬菌体或艾希氏菌噬菌体 E-3;

E-4: 艾希氏菌属的噬菌体;

Ent: 阴沟肠杆菌噬菌体。

部分噬菌体因需求量大自行按双层法<sup>[1]</sup>制备获得,与标准噬菌体效价相当。

### 1.2 方法

**1.2.1 平板法:** 将细菌分离纯化后接种于营养肉汤,作生化鉴定。另分 4 组于 37℃ 分别培养 2h、6h、10h 及 ≥ 18h,培养所得悬液(已浑浊者须做 200~400 倍稀释)均匀地涂抹于已烘至稍有花纹的琼脂

平板上,待菌液自然干后,按 O-1、C、Sh、E、CE、E-4、Ent 的顺序依次滴加 2 $\mu$ L 的噬菌体,平板干燥后,于 37℃ 倒置培养 6h 及过夜并观察试验结果。观察标准为菌苔上出现噬菌斑为阳性,用“CL”表示,反之为阴性用“-”表示。

**1.2.2 液体法:** 细菌分离纯化后接种于营养肉汤,于 37℃ 分别培养 2h、6h、10h 及 ≥ 18h 后,各吸取 0.1mL 滴加到 4 组各 7 个已加 10mL 肉汤并已编号的试管中,然后分别滴加 2 $\mu$ L 的 7 种噬菌体(O-1、C、Sh、E、CE、E-4、Ent),试管混匀后,于 37℃ 下培养 6h 后,每隔 2h 及过夜观察。

**1.2.3 食品样品中几种肠杆菌科细菌的检测:** 从市场上随机抽取海虾仁(30 份)、牡蛎(20 份)、鲜牛肉(30 份)、熟食制品(30 份);另从南京某奶牛场抽取 40 份生牛奶,以生产的原包装放在塑料袋中,保持温度 3℃~5℃。所有样品 2h 内送到实验室,进行细菌选择培养、增菌和提纯,然后按照本文 1.2.1 介绍的平板法进行噬菌体裂解试验和细菌生化鉴定。

## 2 结果

### 2.1 生化鉴定

60 株实验细菌中,沙门氏菌 45 株,大肠杆菌 8 株,志贺氏菌 4 株,变形杆菌 3 株;食品中细菌生化鉴定结果见表 3。

### 2.2 平板法

表 1 显示,培养了 6h 和 10h 的菌液 45 株沙门氏菌被 O-1 噬菌体分别裂解了 42 株和 44 株,与生化鉴定符合率分别达 93.3% 和 97.8%;虽然 O-1 噬菌体也裂解了 1 株大肠杆菌,但交叉裂解率仅为 1.7%。艾希氏菌属噬菌体裂解率为 62.5%,志贺氏菌属检出率为 50.0%;有 1 株沙门氏菌不被任何噬菌体裂解,变形杆菌不与任何噬菌体发生交叉裂解。表 2 显示,试验菌液培养 2h 和 ≥ 18h 后,O-1 噬菌体

表 1 6h 和 10h 培养菌液的 7 种噬菌体裂解结果

菌种	试验株数	噬菌体							阳性数	%
		O-1	C	Sh	E	E-4	CE	Ent		
沙门氏菌属 <i>Salmonella</i>	45	CL	-	-	-	-	-	-	44(42)	97.8(93.3)
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	4	-	-	CL	CL	Δ	CL	-	2(2)	50.0(50.0)
艾希氏菌属 <i>Escherichia</i>	8	CL	-	-	CL	CL	-	-	1(1)	62.5(62.5)
变形杆菌 <i>Mycetozoon</i>	3	-	-	-	CL	CL	-	-	4(4)	0(0)

注:①括号内外分别表示 6h 和 10h 的裂解结果;②“CL”表示融合性裂解,“Δ”表示不裂解,“-”表示可能裂解可能不裂解。

裂解沙门氏菌阳性符合率分别为 91.1% 和 88.9% , 裂解率下降到 25.0%。仍与大肠杆菌有部分交叉裂解 ; 艾希氏菌属噬菌体

表 2 2h 和 ≥18h 过夜培养菌液的 7 种噬菌体裂解

菌种	试验株数	噬菌体							阳性数	%
		O-1	C	Sh	E	E-4	CE	Ent		
沙门氏菌属 <i>Salmonella</i>	45	CL	-	-	-	-	-	-	41(40)	91.1(88.9)
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	4	-	-	CL	-	-	CL	-	2(2)	50.0(50.0)
艾希氏菌属 <i>Escherichia</i>	8	CL	-	CL	-	CL	-	-	1(1)	25.0(25.0)
变形杆菌 <i>Mycetozoon</i>	3	-	-	-	CL	CL	-	-	1(1)	33.3(33.3)

注: ①括号内外分别表示 ≥18h 和 2h 的裂解结果; CL 表示融合性裂解; - 表示不裂解。

### 2.3 液体法

液体法裂解试验, 滴加 O-1 噬菌体的 45 管 × 4 个沙门氏菌培养管中, 培养 2h、6h、10h 和 ≥18h 的菌液分别有 4 管、8 管、15 管和 10 管能观察到由清变浊再澄清的现象; 其余试管均未观察到明显的裂解现象。

### 2.4 食品样品中几种肠杆菌科细菌的检测结果

食品样品中细菌经培养不同时间后的噬菌体裂解结果显示(表 3): 食品中沙门氏菌的噬菌体检测特异性和敏感性较好, 统计发现, 菌液培养 10h 沙门氏菌、大肠杆菌和志贺氏菌与生化鉴定结果的符合率分别达 90.5%、66.7% 和 75.0%, 其余符合率均低于 10h 时。可见噬菌体裂解沙门氏菌的效果是肯定的, 菌液最佳培养时间约为 10h。

表 3 食品中几种肠杆菌科细菌的阳性检出率(%)

菌种	处理	样品					
		海虾仁	牡蛎	鲜牛肉	熟食制品	牛奶	
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	生化鉴定	20.0(6/30)	20.0(4/20)	13.3(4/30)	20.0(6/30)	2.5(1/40)	
	平板法裂解	2h	13.3(4/30)	15.0(3/20)	6.7(2/30)	16.7(5/30)	0(0/40)
		6h	16.7(5/30)	20.0(4/20)	10.0(3/30)	16.7(5/30)	0(0/40)
		10h	20.0(6/30)	20.0(4/20)	10.0(3/30)	16.7(5/30)	2.5(1/40)
		≥18h	10.0(3/30)	15.0(3/20)	3.3(1/30)	10.0(3/30)	0(0/40)
艾希氏菌属 <i>Escherichia</i>	生化鉴定	16.7(5/30)	35.0(7/20)	13.3(4/30)	13.3(4/30)	10.0(4/40)	
	平板法裂解	2h	6.7(2/30)	20.0(4/20)	3.3(1/30)	0(0/30)	2.0(1/40)
		6h	10.0(3/30)	15.0(3/20)	10.0(3/30)	0(0/30)	5.0(2/40)
		10h	13.3(4/30)	20.0(4/20)	13.3(4/30)	6.7(2/30)	5.0(2/40)
		≥18h	3.3(1/30)	5.0(1/20)	0(0/30)	3.3(1/30)	2.5(1/40)
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	生化鉴定	0(0/30)	10.0(2/20)	16.7(5/30)	13.3(4/30)	2.5(1/40)	
	平板法裂解	2h	0(0/30)	5.0(1/20)	3.3(1/30)	6.7(2/30)	0(0/40)
		6h	0(0/30)	5.0(1/20)	0(0/30)	6.7(2/30)	0(0/40)
		10h	0(0/30)	5.0(1/20)	13.3(4/30)	13.3(4/30)	0(0/40)
		≥18h	0(0/30)	0(0/20)	0(0/30)	3.3(1/30)	0(0/40)

注: 括号中分子为阳性份数, 分母为检测总份数。

## 3 讨论

目前, 用噬菌体鉴定细菌的方法利用较为普遍,

如用噬菌体检测大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等<sup>[11-14]</sup>。关于沙门氏菌噬菌体的研究也很多<sup>[10, 15, 16]</sup>。在实践中, 加强对食品中沙门氏菌等肠

杆菌科细菌的检测力度,特别是进行实时、大量、准确而快速的检测,对预防和控制由沙门氏菌等引发的食物中毒有重要的意义。本研究利用肠杆菌科组合噬菌体裂解培养不同时间的肠杆菌科细菌,并与常规的生化分析比较,主要分析组合噬菌体裂解沙门氏菌的特异性和敏感性,并模拟噬菌体裂解试验中待试菌的最佳培养时间。

实验结果表明组合噬菌体对沙门氏菌的敏感性和特异性均较高,当待试菌液培养 10h 达最佳,此为增强细菌阳性检出率提供了一定的理论依据。另外,用液体法裂解细菌时,由于细菌和噬菌体都极易产生抗性,管内营养共享,随着细菌的不断繁殖,噬菌体的不断扩增,细菌、噬菌体在同一混合环境下反复作用,效价降低,导致观察结果错误,假阴性显著偏高,故此法不宜用作噬菌体裂解试验。但试验仍显示试验菌培养 10h 时裂解效果较好。

对食品(150份)的实际检测发现,噬菌体裂解细菌对试验细菌的培养时间的要求基本一致,即4个培养时间中,培养 10h 时的检测效果最佳,其次分别是 6h、2h 和  $\geq 18$ h。可能原因是噬菌体靠细菌表面特异性受体的吸附而作用细菌,细菌所处生长阶段不同,表面受体也不同,吸附噬菌体的能力也就不同。而培养 10h 的细菌受体已充分暴露在其表面而易被其特异性噬菌体识别。与单纯的实验室细菌检测相比,实际检验中也存在一定的假阴性,可能原因是这类细菌或其表面没有相关的受体。但这对实验结果的判定不会造成很大影响,可据其特异的生化特性简单的做生化试验分析将其分属。实验中出现部分交叉裂解,说明交叉裂解的两种细菌表面可能存在相同或相似的受体<sup>[17]</sup>,这对噬菌体的特异性有一定的影响。因此,如果使用单个噬菌体鉴定判断,可能会得出错误结论,组合噬菌体却能克服这一问题。

综上所述,本实验基于组合噬菌体检测细菌的方法,模拟试验菌液培养时间,发现高阳性检出率时待试菌的最佳培养时间为 10h。总体来说,该利用

噬菌体检测沙门氏菌的方法有确实的效果,具有快速、操作方便和经济等优点;属外交叉较少,即使有个别交叉裂解,经生化鉴定也可将其归属,不影响结果的判定。单独的 O-1 噬菌体或少数肠杆菌科噬菌体与其它噬菌体组合可能同时检测更多的食源性病原菌,但本试验未进行深入的探讨,因此,关于组合噬菌体同步检测细菌的可能性还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Manzano M, Coccolin L, Astori G, *et al.* Molecular and cellular probes, 1998, **21**: 227 ~ 234.
- [2] Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Molecular and cellular probes, 2004, **18**: 333 ~ 339.
- [3] 刘斌, 史贤明. 微生物学通报, 2006, **33**(2): 156 ~ 161.
- [4] Riad E M, Taniós A I, EL-Moghny AFA, *et al.* Assiut Veterinary Medical Journal, 1998, **39**(78): 324.
- [5] Zamora B M, Hartung M, Hilebrande G. Journal Veterinary Medical Series B, 1999, **46**(1): 229 ~ 238.
- [6] McDonough P L, Jacobson R H. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1998, **5**(4): 550 ~ 555.
- [7] Soumet C, Ernel G, Rose V, *et al.* Letters: In Applied Microbiology, 1999, **29**(1): 1 ~ 6.
- [8] 何晓青. 卫生防疫细菌检验. 南昌: 新华出版社, 1989, pp. 651 ~ 670.
- [9] Mosier-boss P A, Lieberman S H, Andrews J M, *et al.* Applied Spectroscopy, 2003, **57**: 1138 ~ 1144.
- [10] Kodzius R, Rhyner C, Konthur Z, *et al.* Combinatorial Chemistry & Throughput Screening, 2003, **6**: 143 ~ 151.
- [11] 何晓青, 潘若男, 何俭. 《中华人民共和国国家标准: 食品卫生微生物学检验》. GB/T 4789. 31 ~ 2003, 北京: 中国标准出版社, 2003, pp. 251 ~ 258.
- [12] 鲁会军, 韩文瑜, 雷连成, 等. 中国兽药杂志, 2002, **36**(5): 28 ~ 31.
- [13] 林建阳, 于天凤. 数理医药学杂志, 2002, **15**(3): 256 ~ 257.
- [14] 霍开兰, 陈道利, 刘燕. 安徽预防医学杂志, 2006, **12**(4): 240 ~ 241.
- [15] 曾九成, 吴振寰. 中成药, 1984, **8**: 13 ~ 14.
- [16] 宋克云. 实用预防医学, 2004, **11**(3): 551 ~ 552.
- [17] Gershman M, Markowsky B. Clinic Microbiology, 1983, **17**: 24.