

革兰氏阴性杆菌、弧菌 新编码鉴定法的建立和应用研究

徐迪诚 郑秀英 杨暑伏 孙芝军
王艳 赵卓 姜远珠

(哈尔滨市卫生防疫站, 黑龙江省哈尔滨市 150010)

蔡妙英 赵玉峰 卫军 东秀珠

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 细菌种类不同,其生化特征不一。本文对革兰氏阴性杆菌、弧菌等4个科、36个菌属、103个种及4个生物群的细菌进行7位数编码,建立了新革兰氏阴性杆菌、弧菌编码鉴定法。为此,编著《革兰氏阴性杆菌、弧菌新编码鉴定手册》,介绍此法的理论、有关技术及编码检索表。制备出发酵型与氧化型共用的一套鉴定系列培养基,并对部分培养基作了改良。使用新编鉴定法鉴定23个菌属709株标准菌株及临床参考菌株,与常规法鉴定结果的鉴定符合率为97.74%。本法的操作简单,判定容易,应用面广,是目前我国的最佳方法,适合基层实验室使用。与法国的API-20E比较,具有编码数量大,培养基配制简易,成本费用低等特点,颇有推广价值。

关键词 革兰氏阴性杆菌;弧菌;新编码鉴定法

许多革兰氏阴性杆菌、弧菌等(包括肠杆菌科及其以外的不发酵葡萄糖革兰氏阴性杆菌与弧菌科细菌),是引起人类和动物感染症的致病菌。为了适应临床病原诊断、感染症合理化疗、卫生学与流行病学调查、商检、兽医以及科研教学的需要,对这一大类细菌要求做出快速鉴定。80年代初,国外兴起的革兰氏阴性杆菌编码鉴定法和与之配套的专用鉴定板^[1],是借助电子计算机统计分析的技术,优化鉴定特征,提高鉴定准确性的一种先进方法。为了改变我国这方面的落后状况,1984年著者建立了四位数编码的革兰氏阴性杆菌编码鉴定法和两套鉴定系列培养基^[2],为菌种鉴定工作标准化和规范化开创了一条新路,推广后收到很好的效益^[3-4]。

然而,随着微生物学技术的进步,许多新菌种陆续被开发,因为原有的四位数编码囊括的细菌种类有限,影响新种检出。1992年起,我们又重新研究建立七位数的革兰氏阴性杆菌、弧

菌新编码鉴定法和与之配套的专用鉴定系列培养基。可使用这套鉴定系列培养基鉴定4个科36个菌属103个种及4个生物群细菌包括7258个编码。现总结报告如下:

材料与方 法

(一) 材料

1. 编码检索工具书:由本文作者编著约50万字的《革兰氏阴性杆菌、弧菌新编码鉴定手

此项研究承卫生部长春生物制品研究所、农业科学院哈尔滨兽医科学研究所、吉林省地方病防治研究所、黑龙江省临床检验中心、河北省临床检验中心、哈尔滨医科大学附属第一医院、齐齐哈尔市第一医院、山东潍坊医学院、黑龙江省农场总局总医院、哈尔滨铁路中心医院、辽宁省卫生防疫站、锦州市卫生防疫站、西安铁路局中心卫生防疫站、海拉尔市卫生防疫站和哈尔滨市道里区卫生防疫站大力协助,衷心感谢。参加部分研究工作的有:王世平、于振喜、张丹英、张慧兰、杜淑芬、黄明越。

册》(以下简称《手册》),介绍此法的原理、鉴定系列培养基配制和使用方法,编码检索表,近似菌鉴别表及分类鉴定参考资料等^[5-7]。

2. 实验菌株:共 709 株。其中标准菌株 107 株,由中国科学院微生物研究所、中国药品生物制品检定所、中国农业科学院哈尔滨兽医科学研究所、卫生部长春生物制品研究所等单位提供;临床菌株 602 株,分离自腹泻、食物中毒及临床感染等病人标本,由辽宁省卫生防疫站、山东潍坊医学院、哈尔滨医科大学附属第一医院、黑龙江省农场总局总医院、哈尔滨铁路中心医院、黑龙江省临床检验中心、河北省临床检验中心等单位提供。

3. 培养基:(1)分离纯化菌种培养基:按细菌不同种类,分别使用麦康凯、TCBS(硫代硫酸钠-柠檬酸钠-胆盐-蔗糖)琼脂、血琼脂和普通营养琼脂。按常规自制^[6]。(2)鉴定系列培养基:包括 ONPG、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、枸橼酸盐、硫化氢、尿素、SIM、VP、明胶、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、密二糖、苦杏仁甙、阿拉伯糖及氧化酶试纸条。ONPG、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、枸橼酸盐、明胶及糖醇类 13 种培养基按文献 6 自制;对尿素、VP、SIM、苦杏仁甙、硫化氢及氧化酶试纸等 6 种的成分与制作方法进行了改良(表 1)。(3)鉴定系列对照:为法国 bio Mérieux 生产的 API-20E,系日本国高知医学代表访华团惠赠。(4)O/129 纸片及试验用 M-H 培养基:弧菌科细菌常规鉴定用。按文献^[8]自制。

(二) 方法

1. 菌种纯化:将标准菌株和统一鉴定过的临床革兰氏阴性杆菌及弧菌,按种类不同分别在麦康凯、TCBS 琼脂、血琼脂平板上划线接种,37℃培养 2 代,挑取典型菌落接种普通琼脂斜面 and 血琼脂斜面各 1 支。

2. 接种鉴定系列培养基观察其特异性、敏感性 & 稳定性:将普通琼脂或血琼脂斜面的 18-24 h 培养物接种于鉴定系列培养基;3 种氨

基酸培养基在接种后加入灭菌液体石蜡 0.5ml,置 37℃培养;发酵型细菌在 18-24 h,氧化型细菌在 24-48 h 观察反应结果。

表 1 改进的鉴定系列培养基与试纸

培养基名称	改进后的主要成分
尿素	尿素 0.2%, 琼脂 1%, 0.5kg/cm ² 15 分一次灭菌
VP	在原处方基础上,增加植物朊 0.5%、酵母膏 0.1%、琼脂粉 0.3%
SIM	见文献 ^[2]
苦杏仁甙	糖、醇基础液中含苦杏仁甙 0.3-0.5%、琼脂 0.3%
氧化酶试纸	加入保护剂,制成干燥纸条(一年内使用有效)
硫化氢	从 TSI 配方中除去葡萄糖、乳糖及蔗糖

将制成的鉴定系列培养基放 4℃条件保存,3 个月、6 个月及一年后,任意抽出 3 套,同时用 API-20E 对比,接种标准菌种观察反应的一致性。

3. 判定结果:按表 2 列出的方法。

4. 数码计数:凡反应阳性者按表 3 的数值记为 1、2、4;反应阴性者记为 0。尔后,依次将 3 项反应的阳性结果数值相加,最后组成一组 7 位数编码。将一株未知的革兰氏阴性杆菌鉴定结果列于表 3。

5. 检索菌名:查《手册》中的检索表,找出 7 位编码的相应菌名。如 1 株疑似弧菌的鉴定编码为 7206520,其相对应的菌名为梅氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*),鉴定概率%=99.9,为最可信鉴定(表 3)。

结 果

(一) 编著出《革兰氏阴性杆菌、弧菌新编码鉴定手册》

检索用工具书约 50 万字,系统介绍新编码鉴定法原理、使用方法、鉴定系列培养基制法、

表2 新编码鉴定法培养基实验结果的判定要点

检查项目	培养基	观察部位	反应结果		备注
			阳性	阴性	
β-半乳糖苷酶	ONPG	液体全部	培养基变黄色	无变化	
精氨酸双水解酶	精氨酸	高层	培养基变红色	无变化	氨基酸对照为橘黄色
赖氨酸脱羧酶	赖氨酸	高层	培养基变紫色	黄色	氨基酸对照为黄色
鸟氨酸脱羧酶	鸟氨酸	高层	培养基变紫色	黄色	氨基酸对照为黄色
枸橼酸盐利用	枸橼酸盐 (西蒙氏)	斜面	培养基变蓝 (或生长)	无变化	接种菌量要少
硫化氢	去糖的三糖铁	斜面	培养基变黑色	无变化	沿穿刺线变黑色
尿素酶	克氏尿素	斜面	斜面变红色	无变化	
靛基质/丙酮酸(IPA)	SIM	上层 (或全部)	褐色	无变化	观察色氨酸后,加入 Kovac 氏试剂
靛基质	SIM	上层	加试剂变红色	无变化	
VP 反应	VP	高层	加试剂变红色	无变化	
明胶酶	明胶	高层	培养基液化	无变化	从 37℃ 温箱取出后放 4℃ 冰箱,或在冷水中迅速冷却,然后观察
糖、醇类氧化、发酵	9 种糖醇	高层	培养基变黄	无变化	氧化型细菌在表层观察,注意排除色素干扰
氧化酶	干燥纸条	接种部位	接种菌部位 变紫色	无变化	用蒸馏水浸湿后接种

结果判定和菌名编码检索。可用于检索肠杆菌科、弧菌科、巴斯德菌科和假单胞菌科中与医学有关的 36 个菌属、103 个菌种及 4 个生物群细菌,共有细菌名称编码 7258 个。该《手册》比法国 API-20E 增加 1 个菌属、3 个新种和 8 个编码^[9](表 4),其中包括我国发现的、引起酵米面

食物中毒的椰毒假单胞菌。《手册》附有相关细菌鉴别表、革兰氏阴性杆菌生化特征阳性率表及最新革兰氏阴性杆菌、弧菌鉴定参考表和资料(包括未编入的新属、种)。

(二) 鉴定系列培养基的研制

表3 一株未知革兰氏阴性杆菌的鉴定结果(试例)

特征	ONPG	精氨酸	赖氨酸	鸟氨酸	枸橼酸	硫化氢	尿素	色氨酸	靛基质	V P	明胶	葡萄糖	甘露醇	肌醇	山梨醇	鼠李糖	蔗糖	蜜二糖	苦杏仁甙	阿拉伯糖	氧化酶	鉴定菌名
数值	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
反应结果	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	梅氏弧菌 (<i>Vibrio metschnikovii</i>)
应得数值	1	2	4	0	2	0	0	0	0	0	2	4	1	0	4	0	2	0	0	0	0	
组合编码	7			2			0			6			5			2			0			

表4 革兰氏阴性杆菌新编码鉴定法鉴定709株菌的结果

菌名	菌株数	符合数	不符合数	菌名	菌株数	符合数	不符合数
埃希氏菌属				小肠结肠炎耶尔森氏菌	22	22	0
大肠埃希氏菌	109	108	1	克氏耶尔森氏菌	1	1	0
志贺氏菌属				假结核耶尔森氏菌	2	2	0
志贺氏菌(含4个种)	98	97	1	克吕沃氏菌属			
沙门氏菌属				抗坏血酸克吕沃氏菌	1	1	0
伤寒沙门氏菌	24	24	0	洒冷克吕沃氏菌	1	1	0
其它沙门氏菌	74	74	0	弧菌属			
柠檬酸杆菌属				勒恩拉氏菌属			
弗氏柠檬酸杆菌	11	11	0	水勒恩拉氏菌	1	1	0
克雷伯氏菌属				霍乱弧菌(包括EL-Tor生物	15	15	0
肺炎克雷伯氏菌	49	49	0	型和非0-1群霍乱弧菌			
产酸克雷伯氏菌	5	5	0	其它致病弧菌	28	25	3
肠杆菌属				(河弧菌、拟态弧菌等8个种)			
阴沟肠杆菌	14	14	0	气单胞菌属			
成团肠杆菌	5	5	0	嗜水气单胞菌	17	17	0
产气肠杆菌	2	1	1	杀鲑气单胞菌	1	1	0
日勾维肠杆菌	1	1	0	邻单胞菌属			
中间肠杆菌	4	4	0	类志贺邻单胞菌	40	36	4
河生肠杆菌	4	4	0	假单胞菌属			
欧文氏菌属				铜绿假单胞菌	47	46	1
解淀粉欧文氏菌	1	1	0	腐败假单胞菌	6	6	0
沙雷氏菌属				嗜麦芽假单胞菌	6	6	0
粘质沙雷氏菌	5	5	0	产硷假单胞菌	5	5	0
液化沙雷氏菌	5	5	0	恶臭假单胞菌	3	3	0
深红沙雷氏菌	1	1	0	类产硷假单胞菌	3	2	1
居泉沙雷氏菌	2	2	0	施氏假单胞菌	3	1	2
气味沙雷氏菌	1	1	0	缺陷假单胞菌	1	1	0
哈夫尼菌属				产硷菌属			
蜂房哈夫尼菌	4	4	0	洋葱假单胞菌	6	6	0
爱德华氏菌属				假单胞菌(未定种)	8	8	0
迟钝爱德华氏菌	3	3	0	粪产硷菌	3	3	0
变形菌属				黄杆菌属			
普通变形菌	4	4	0	香味黄杆菌	2	2	0
奇异变形菌	25	25	0	大比目角黄杆菌	1	1	0
普罗威登斯菌属				脑膜炎脓毒黄杆菌	1	1	0
产硷普罗威登斯菌	2	2	0	不动杆菌属			
斯氏普罗威登斯菌	3	3	0	乙酸钙不动杆菌无硝变种	14	12	2
雷氏普罗威登斯菌	8	8	0	乙酸钙不动杆菌鲁氏变种	1	1	0
摩根氏菌属				合计	709	693	16
摩氏摩根氏菌	6	6	0		(97.74%)	(2.26)	
耶尔森氏菌属							

鉴定系列培养基为发酵型和氧化型细菌共用。对培养基进行配方成分、制作方法研究,并进行特异性、敏感性、稳定性和各批次间均一性的质量检测。

1. 培养基成分及操作判定方法:

对其中6种培养基的剂型、成分做了系统研究。其中尿素培养基的尿素含量由2%降为0.2%,0.5kg/cm²15min灭菌。SIM培养基不加试剂可直接观察靛基质丙酮酸(IPA),在同一管中加试剂后又可观察靛基质,使用一管培养基可同时观察4项特征,节省试剂,减少了操作手续。在常规用VP试验培养基中,加入0.5%植物蛋白胨和0.3%琼脂,使VP试验结果由常规试验的2-3天缩短到24h可同步观察,反应结果准确可靠。硫化氢测定用TSI基础液,不加葡萄糖、蔗糖和乳糖。苦杏仁甙培养基中的苦杏仁甙含量,当浓度<0.2%时,阳性结果反应不稳定,浓度>0.8%时,对某些细菌产生毒性,故选择0.3-0.5%的浓度,结果反应正常,对细菌无毒性反应。氧化酶试验纸制备时,加入维生素C为稳定剂,可保存一年有效。

将鉴定系列培养基在4℃保存9-12个月时接种标准菌,有的阿拉伯糖、蜜二糖管的色泽

轻微变黄。其他各种生化培养基均可保存一年以上不变色。各批次培养基同时用法国产API-20E系统作对照抽检,两种培养基对同一菌的鉴定结果一致。

2. 鉴定系列培养基实际应用效果:对23个菌属72个菌种的709株进行鉴定,与常规法鉴定结果比较,两法鉴定结果符合菌株为693株,符合率为97.74%(表4),其中标准菌株107株,符合105株,占98.13%。应用本法从收集的602株菌中鉴定出8个新菌种,它们分布在7个菌属(表5,6)。这些新种经常规法和API-20E复核,鉴定结果与本法相同。

在鉴定的709株菌中,本法鉴定结果与原鉴定结果不一致的有16株菌,占2.26%,其中14株为临床菌株,2株为标准菌株。探讨本法与原鉴定结果不符合的原因,认为有四种情况:①由于分类位置变更,如1970年从国外分离的1株大肠埃希氏菌,其赖氨酸与鸟氨酸脱羧酶均阴性,应属于非脱羧勒克氏菌;②鉴定系列培养基中苦杏仁甙与阿拉伯糖管反应弱,37℃48h后未显示明显结果;③鉴定副溶血性弧菌时未事先加入适量氯化钠,培养物生产不良;④5株来自山东潍坊医学院的临床菌株不符合原因尚待进一步确定。

表5 《革兰氏阴性杆菌、弧菌新编码鉴定手册》新编入的新种及其编码

菌名	新编号码 ^①	与近似种的鉴别特征	菌种来源
温和气单胞菌	7246146 ^[10]		江苏省海安县卫生防疫站,病水貂脏器
非脱羧勒克氏菌	1044152 ^[11]	PUGA 试验(-)	哈尔滨市卫生防疫站,腹泻便
非脱羧勒克氏菌	1204742 ^[11]	PUGA 试验(-)	哈尔滨市卫生防疫站,腹泻便
椰毒假单胞菌	1204403 ^[12]	D-酒石酸盐(+)	荷兰标准株(NCIB 9450)
椰毒假单胞菌	1204503 ^[12]	D-酒石酸盐(+)	荷兰标准株(NCIMBI 2451) 山东潍坊医学院
椰毒假单胞菌	1204703 ^[12]	D-酒石酸盐(+)	食物中毒臭米面(鸡西7406)
椰毒假单胞菌	1204503 ^[12]	D-酒石酸盐(+)	食物中毒臭米面(T7707-a)
椰毒假单胞菌	1204503 ^[12]	D-酒石酸盐(+)	食物中毒臭米面(T7707-b)

①资料来源于文献号

表6 使用新编码鉴定法在国内首次检出的新菌种

来源	菌名	株数	编码
分泌物	中间肠杆菌	3	1305572
痰	河生肠杆菌	1	3315543
痰	河生肠杆菌	1	3315572
临床标本	河生肠杆菌	2	3305572
虾糖	成团肠杆菌	1	1205753
脓汁	成团肠杆菌	1	3215373
脓汁	成团肠杆菌	1	3004333
痰	成团肠杆菌	1	1204771
痰	日沟维肠杆菌	1	1315173
感染症	居泉沙雷氏菌	1	1104553
感染症	气味沙雷氏菌	1	5207773
感染症	水恩拉氏菌	1	1205561
腹水	杀蛙气单胞菌	1	2007124
痰	解淀粉欧文氏菌	1	0004522
脑脊液	大比目鱼黄杆菌	1	0046004
腹泻便	非脱羧勒克氏菌	2	1044152
腹泻便	非脱羧勒克氏菌	1	1204742

讨 论

细菌编码鉴定法是根据细菌的生物学特征,对糖醇类不同代谢途径的不同代谢产物,用电子计算机技术编程的一种科学方法。80年代以来,细菌鉴定工作由细胞水平向分子水平发展,由于细菌分类学变化和检测技术的进步,新的细菌不断发现,原来的传统鉴定法已不能适应实际工作需要。因此,产生了用计算机技术表达细菌生物学特征的细菌编码鉴定技术。我们参考法国 API-20E 细菌鉴定试验板的生化排列顺序和生化反应结果编制数值,改进糖、醇生化培养基成分和剂型,新研制 5 种生化培养基和氧化酶试验纸片,组成了包括肠杆菌科、弧菌科、巴斯德菌科和假单胞菌科 4 个科,36 个菌属,103 个种和 4 个生物群的发酵型、氧化型细菌共用的革兰氏阴性杆菌鉴定系列培养基。其成分构成合理,能及时准确地表达各种细菌的生化特征。培养基的特异性强,敏感性高,稳定

性好。其中苦杏仁甙、硫化氢、尿素、VP、SIM 试验用培养基均系自行研制。除苦杏仁甙外,均用国产试剂,成本低,每套成本仅为法国 API-20E 的 1/8,能节约大量外汇。使用发酵型细菌和氧化型细菌均能表达反应结果的同一套培养基,在国内的细菌编码鉴定法中尚属首次,从而使鉴定操作更加简便。

在我们编著的《手册》中,增加了 API-20E 检索表中尚未列出的近年在国内发现的 3 个新菌种和 8 个新编码(表 5),将过去的非脱羧埃希氏菌归类于非脱羧勒克氏菌,为我国的革兰氏阴性杆菌、弧菌新种不断开发提供了科学手段。近年来,国内不少单位应用此项技术提供的方法检出了一批新菌种,可以充分证明这一点。它的功用由于适时增加新的信息编码而更加适合我国的需要,并且有自己的特色。

本鉴定方法由一本较完整的《手册》和革兰氏阴性杆菌、弧菌用的鉴定系列培养基组成,实际应用结果表明了它的优越性在于:

1. 可使革兰氏阴性杆菌、弧菌的鉴定操作简便化和规范化。
2. 《手册》包括属种数多于国内已有同类鉴定系统。
3. 细菌鉴定特征可以对照标准色板判定结果,易于掌握,可减少判定误差。
4. 《手册》的编码检索表与鉴定系列培养基的特征和结果相对应,细菌名称与当前的细菌分类相对应,使细菌分类学与实际应用紧密结合。

因此,此项应用技术适于在我国各微生物实验室使用,不仅能提高革兰氏阴性杆菌与弧菌鉴定的准确性,推进医疗、预防科研工作进步,还可节省大量外汇,进一步推广,将收到明显的社会效益和经济效益。

通过考核应用,有 2.26% 的菌株鉴定结果与原鉴定不符,其原因是多方面的,尚待今后进一步研究解决。

参 考 文 献

1. 古田格: Medical Technology, 15(3): 257, 1987.

2. 徐迪诚等:哈尔滨医药,4(3):132,1984.
3. 杨暑优等:中国公共卫生学报,9(1):28,1990.
4. 郑秀英等:中华流行病学杂志,11(特4):107,1990.
5. Farmer J J et al. ; *J. Clin Microbiol.* ,21(4):46,1986.
6. Lennette E H et al. ; *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. , pp. 263. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1985.
7. Buchanan R E, Gibbons N E, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1984.
8. 徐迪诚等:微生物学通报,16(4):247,1989.
9. 純薬株式会社;アピ20 プロフタイル イソデックス pp. 6, 东京, 1986.
10. 王广和等:中国人兽共患病杂志,4(6):6,1988.
11. 蔡妙英等:微生物学报,32(2):119,1992.
12. Zhao Naixing et al. ; *J. Microbiol.* ,1(1):52,1988.