

BIOLOG 细菌自动鉴定系统的应用与研究

谢家仪 王永力

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 利用 BIOLOG Microstation 细菌自动鉴定系统对环境来源的 20 个属 90 株菌进行了检测, 同时以传统方法进行验证。24h BIOLOG 系统鉴定结果: 62 株革兰氏阴性菌中, 58 株准确鉴定到属的水平 (93.5%), 52 株准确到种的水平 (83.9%)。28 株革兰氏阳性菌中, 25 株准确到属的水平 (89.3%), 11 株准确到种的水平 (39.3%), 总计属的水平准确率 92.2% (83/90), 种的水平准确率 70.0% (63/90), 其中环境来源的菌株准确率高于临床样品。本文还对某些属遇到的问题进行了讨论。

关键词 BIOLOG 系统, 细菌鉴定

近年来, 随着临床微生物学的发展, 微生物鉴定自动化的研究越来越得到重视。有关细菌自动化鉴定系统的研究, 主要集中在以下方面: ①操作、检测的高度自动化; ②底物、指示剂或抑制剂的改良; ③鉴定时间的缩短; ④测试、处理数据的增加等。目前应用较多的商品自动鉴定系统主要有: VITEK 系统、MIDI 系统、BIOLOG 系统、SENSITITRE 系统、AUTOSCEPTOR 系统及 MICROSCAN 系统等^[1]。

由于系统原理及数据库的限制, 多数系统仅适用于临床样品的检测, 随着环境来源的条件致病菌的不断增多和对环境微生物的研究、应用, 那些数据库广, 鉴定范围大的系统会有更广泛的应用范围。

Biolog 公司根据细菌代谢的氧化-还原过程于 1989 年推出了适于环境、临床细菌鉴定的 Biolog Microstation 自动鉴定系统。该系统依据每种细菌形成各自特有的“代谢指纹”图谱为鉴定依据^[2,3]。在 1991 年做为 100 项重要技术之一获美国 R&D 奖。

我所于 1992 年底引进国内第一台 Biolog 系统, 本文即是对两年多工作的研究和总结。

1 材料和方法

1.1 测试菌株

90 株测试菌株包括典型菌株和样品分离

菌株, 来源于土壤、污水等环境和临床样品。划线纯化后, 确定革兰氏阳、阴性。经 Biolog 鉴定系统检测, 同时以传统鉴定方法验证。两方法结果一致时认为结果正确, 不一致时, 以传统方法为主。

1.2 材料

无菌生理盐水 (0.85% NaCl), pH5.5~7.0。

无菌棉签、无菌吸管。

8 孔移液器 (Biolog 公司)。

浊度计 (Biolog 公司)。

浊度标准 (Biolog 公司)。

BUGM 培养基 (Biolog 公司)。

TSA 培养基 (Difco 公司)。

Biolog Microstation 系统。

1.3 操作过程

1.3.1 样品准备: G⁻细菌在 TSA 培养基上划线培养 12~18h; G⁺细菌在 BUGM 培养基上划线培养 12~18h。

1.3.2 菌悬液准备: 用无菌棉签擦下几个单菌落于生理盐水中, 制成菌悬液, 用浊度计调整至适当浓度范围 ($3\sim6\times10^8$ / ml)。

1.3.3 接种: 用 8 孔移液器将菌悬液分加在鉴定板的各孔中, 每孔 150 μ l, 共 96 孔。

表1 BIOLOG 系统对 G-菌鉴定结果(24h)

种名	菌株来源	准确鉴定		种名	菌株来源	准确鉴定	
		属	种			属	种
不动杆菌				亚特兰大莫拉氏菌			
<i>Acinetobacter</i> spp.		1/1	0/1	<i>M. atlantae</i>	临床	1/1	1/1
沃夫不动杆菌	临床			牛莫拉氏菌		1/1	0/1
<i>A. lwoffii</i>		1/1	0/1	<i>M. bovis</i>			
气单胞菌				假单胞菌		17/18	15/18
<i>Aeromonas</i> spp.		2/2	2/2	<i>Pseudomonas</i> spp.			
中间气单胞菌	环境			铜绿假单胞菌	临床	1/1	1/1
<i>A. media</i>		1/1	1/1	<i>P. aeruginosa</i>			
维罗那气单胞菌				产碱假单胞菌	环境	2/2	2/2
<i>A. veronii</i>		1/1	1/1	<i>P. alcaligenes</i>			
产碱菌				洋葱假单胞菌	环境	1/1	1/1
<i>Alcaligenes</i> spp.		3/3	3/3	<i>P. cepacia</i>			
反硝化产碱菌				荧光假单胞菌	环境	5/6	5/6
<i>A. denitrificans</i>		1/1	1/1	<i>P. fluorescens</i>			
粪产碱菌	环境			嗜麦芽假单胞菌	环境	1/1	0/1
<i>A. faecalis</i>		1/1	1/1	<i>P. maltophilia</i>			
木糖氧化产碱菌				门多萨假单胞菌	环境	1/1	1/1
<i>A. xylosoxydans</i>		1/1	1/1	<i>P. mendocina</i>			
色杆菌				恶臭假单胞菌	环境	4/4	3/4
<i>Chromobacterium</i> spp.	环境	2/2	2/2	<i>P. putida</i>			
紫色色杆菌				丁香假单胞菌	环境	2/2	2/2
<i>C. violaceum</i>		2/2	2/2	<i>P. syringae</i>			
肠杆菌				沙雷氏菌		4/4	4/4
<i>Enterobacter</i> spp.		4/6	4/6	<i>Serratia</i> spp.			
阴沟肠杆菌				液化沙雷氏菌	临床	1/1	1/1
<i>E. cloacae</i>	临床	3/5	3/5	<i>S. liquefaciens</i>			
霍氏肠杆菌				粘质沙雷氏菌	环境	3/3	3/3
<i>E. hormaechei</i>		1/1	1/1	<i>S. marcescens</i>			
欧文氏菌				弧菌		7/7	6/7
<i>Erwinia</i> spp.		7/8	6/8	<i>Vibrio</i> spp.			
解淀粉欧文氏菌				溶藻弧菌	临床	1/1	1/1
<i>E. amylovora</i>	环境	2/2	2/2	<i>V. alginolyticus</i>			
胡萝卜软腐欧文氏菌				鳃弧菌	环境	1/1	1/1
<i>E. carotovora</i>		5/6	4/6	<i>V. anguillarum</i>			
埃希氏菌				河流弧菌	环境	1/1	0/1
<i>Escherichia</i> spp.	临床/环境	4/4	4/4	<i>V. fluvialis</i>			
大肠埃希氏菌				需钠弧菌	环境	1/1	1/1
<i>E. coli</i>		4/4	4/4	<i>V. natriegens</i>			
黄杆菌				副溶血弧菌	临床	3/3	3/3
<i>Flavobacterium</i> spp.	临床/环境	2/2	2/2	<i>V. parahaemolyticus</i>			
气味黄杆菌				黄单胞菌		2/2	2/2
<i>F. odoratum</i>		2/2	2/2	<i>Xanthomonas</i> spp.			
克雷伯氏菌				野油菜黄单胞菌	环境	2/2	2/2
<i>Klebsiella</i> spp.	临床	1/1	1/1	<i>X. campestris</i>			
肺炎克雷伯氏菌				总计		93.5%	83.9%
<i>K. pneumoniae</i>		1/1	1/1			(58/62)	(52/62)
莫拉氏菌							
<i>Moraxella</i> spp.		2/2	1/2				

1.3.4 培养: 盖上鉴定板盖, 标菌株号, 置培养箱内培养, 一般临床样品 35℃, 环境样品 30℃。培养 4h 或 16~24h。

1.3.5 读取结果: 取出鉴定板, 置阅读器上, 读取结果, 自动检索数据库, 得到鉴定结果。

1.3.6 传统鉴定方法: 参见文献[4]、[5]。

2 结果与讨论

2.1 结果

由于 Biolog 鉴定板分为 GN、GP 两种, 我

们的鉴定结果也分为两部分。

2.1.1 62 株革兰氏阴性菌分布在 14 个属, 32 个种, Biolog 系统在 24h 准确鉴定 58 株到属, 准确率为 93.5%; 准确鉴定 52 株到种, 准确率 83.9% (表 1)。

2.1.2 28 株革兰氏阳性菌分布在 6 个属、12 个种, Biolog 系统在 24h 准确鉴定 25 株到属, 准确率为 89.3%, 准确鉴定 11 株到种, 准确率为 39.3%, 除去芽孢杆菌属, 到种的准确率为 69.2% (表 2)。

表 2 BIOLOG 系统对 G⁺菌鉴定结果(24h)

种名	菌株来源	准确鉴定		种名	菌株来源	准确鉴定	
		属	种			属	种
芽孢杆菌				乳球菌	环境		
<i>Bacillus</i> spp.		15 / 15	2 / 15	<i>Lactococcus</i> spp.		1 / 2	1 / 2
栗褐芽孢杆菌	环境			乳乳球菌	环境		
<i>B. badius</i>		2 / 2	2 / 2	<i>L. lactis</i>		1 / 2	1 / 2
蜡芽孢杆菌	环境 / 临床			红球菌	环境		
<i>B. cereus</i>		5 / 5	0 / 5	<i>Rhoetococcus</i> spp.		3 / 3	3 / 3
坚强芽孢杆菌	环境			马红球菌			
<i>B. firmus</i>		1 / 1	0 / 1	<i>R. equi</i>		3 / 3	3 / 3
地衣芽孢杆菌	环境			葡萄球菌			
<i>B. licheniformis</i>		2 / 2	0 / 2	<i>Staphylococcus</i> spp.	环境 / 临床	3 / 3	3 / 3
巨大芽孢杆菌	环境			金黄色葡萄球菌			
<i>B. megaterium</i>		1 / 1	0 / 1	<i>S. aureus</i>		3 / 3	3 / 3
球形芽孢杆菌	环境			链球菌	临床		
<i>B. sphaericus</i>		1 / 1	0 / 1	<i>Streptococcus</i> spp.		1 / 2	1 / 2
枯草芽孢杆菌	环境			化脓链球菌			
<i>B. subtilis</i>		3 / 3	0 / 3	<i>S. pyogenes</i>		1 / 2	1 / 2
肠球菌	环境			总 计		89.3%	39.3%
<i>Enterococcus</i> spp.		2 / 3	1 / 3			(25 / 28)	(11 / 28)
粪肠球菌	环境			总 计		76.9%	69.2%
<i>E. faecalis</i>		2 / 3	1 / 3	(除去芽孢杆菌)		(10 / 13)	(9 / 13)

2.1.3 对于 68 株环境来源的细菌, Biolog 系统 24h 到属的准确率为 95.6% (65 / 68), 到种的准确率为 70.6% (48 / 68)。如果除去芽孢杆菌属, 到种的准确率为 85.2% (46 / 54)。

对于 22 株临床来源的细菌, 到属的准确率为 81.8% (18 / 22), 到种的准确率为 68.2% (15 / 22)。对于上述 90 株菌, 到属的准确率达 92.2% (83 / 90), 到种的准确率为 70%

(63 / 90), 除去芽孢杆菌, 到种的准确率为 81.3% (61 / 75) (表 3)。

2.2 讨论

与传统方法相比, Biolog 系统操作标准化, 简便、快捷、省却传统方法多种繁琐工作, 如: 配制多种培养基; 做多种生化实验及辅助实验等, 因而大大减少了工作量。纯化后的细菌在 4~24h 即可得到鉴定结果。准确率也很高。特别是对环境细

菌的鉴定要优于其他系统。

表3 BIOLOG 系统对环境来源和临床来源菌株

24h 鉴定准确率百分比

样品来源	属的水平	种的水平
环境样品	95.6% (65 / 68)	70.6% (48 / 68)
临床样品	81.8% (18 / 22)	68.2% (15 / 22)
总计	92.2% (83 / 90)	70.0% (63 / 90)
除去芽孢杆菌干扰		81.3% (61 / 75)

但在使用过程也发现一些问题:

a. 芽孢杆菌在 BUGM 预培养基上易形成芽孢, 根据操作手册上 BUGM+Glu 短时间培养, 挑取不形成芽孢的营养体单菌落, 经蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等多个种检测, 24h 反应孔较少, 多定为栗褐芽孢杆菌, 所以 Biolog 系统对芽孢杆菌鉴定到属较准确, 到种的准确率则很低, 合适的条件仍有待摸索。

b. 肠杆菌、沙雷氏菌等代谢旺盛, 在 4~6h 结果准确, 随着培养时间的增加, 各孔几乎都变阳性。因此, 以短时间 4~6h 结果为准。

c. 由于菌株“地域性”差异, 有些非典型菌株在 24h 后, 相似率仍很低, 使结果不能十分确定, 需传统方法辅以验证。

d. 由于临床来源菌株较少, 所以这方面工作做得不多。因此对于临床来源菌株准确率的评价, 仍有待进一步工作。

另外, 用本系统配合我所基因工程部采用先进的 16Sr RNA 技术做细菌鉴定, 也取得一致满意的结果。

致谢 本工作得到本所卫军同志大力协助, 特此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] Stager C E, Davis J R. *Clinical Microbiology Reviews*, 1992, 5: 302.
- [2] Bochner B. *ASM News*, 1989, 55: 536~539.
- [3] Miller J M, Rhoden D L. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29: 1143~1147.
- [4] Klingler J M, Stowe R P, Obenhuber D C. *et al. Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 2089~2092.
- [5] Krieg N R (Vol. 1), Sneath H A (Vol. 2). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, Vol. 1, 1986, Vol. 2.

APPLICATION AND STUDY OF THE BIOLOG AUTOMATED BACTERIAL IDENTIFICATION SYSTEM

Xie Jiayi Wang Yongli

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Biolog Microstation Identification System was used to identify 90 clinical and enviromental isolates included in 20 genus, and the results were compared with the conventional identifications.

Of the 62 Gram-negative isolates, 58 (93.5%) were correctly identified at the genus level, 52 (83.9%) at the species level at 24 hours. Of the 28 Gram-positive isolates, 25 (89.3%) were correctly identified at the genus level, 11 (39.3%) at the species level at 24 hours. The overall performance of the identification was 92.2% (83 / 90) at he genus level and 70.0% (63 / 90) at the species level. The percentage of correct identification of enviromental isolates was higher than that of clinical isolates. The problems encountered in the application were discussed.

Key words Biolog system, Identification