

微生物生化鉴定的影响因素探究

姜许帆¹ 陆才洋² 蒋芙蓉³ 申景丰³ 夏博³ 刘再德^{3*}

1. 安徽省德元升中医药科技有限公司; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心; 3. 湖南科伦制药有限公司

摘要: 本文以研究微生物生化鉴定 (API 鉴定) 的影响因素为目的, 依据初筛试验结果, 选择对应梅里埃生化鉴定试剂盒对已知微生物进行种属鉴定, 根据不同试验条件下, 微生物鉴定结果的准确性确认影响试验的因素。结果显示, 通过比较不同菌龄对初筛试验的影响以及判断生化试验颜色准确性的不同方法发现采用 18 ~ 24 h 的菌龄、试剂条观察方法采用白色观察背景时, 运用比色卡、垂直观察检查结果最为准确。因此, 本文建议在进行微生物生理生化反应鉴定过程中, 鉴定的微生物应为新鲜、活力强的菌株, 同时企业也要关注颜色判断、培养环境及菌液的浓度。

关键词: 微生物鉴定; 生理生化; 比色法

微生物鉴定是指借助现有的分类系统, 通过对未知微生物的特征测定, 对其进行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分, 或属、种及菌株水平确定的过程, 它是药品微生物检验中的重要环节。微生物鉴定的基本程序包括分离纯化和鉴定, 鉴定时, 一般先将待检菌进行初步的分类。鉴定的方法有表型微生物鉴定和基因型微生物鉴定^[1]。

表型微生物鉴定依据表型特征的表达来区分不同微生物间的差异, 是经典的微生物分类鉴定法, 以微生物细胞的形态和习性表型为主要指标, 通过比较微生物的菌落形态、理化特征和特征化学成分与典型微生物的差异进行鉴别。表型微生物鉴定方法主要有手动生化鉴定方法和自动生化鉴定 (采用设备进行鉴定)。手动生化鉴定有 API 鉴定系统、3M 纸片法、选择与鉴定用培养基法等。

作者简介: 第一作者姜许帆就职于安徽省德元升中医药科技有限公司; 作者陆才洋就职于湖南省药品审评与不良反应监测中心; 作者蒋芙蓉、申景丰、夏博和通讯作者刘再德均就职于湖南科伦制药有限公司。

基因型微生物鉴定依据核酸测序, 比较未知微生物的 DNA 与已知微生物的 DNA 比较, 然后与经验证过的专用数据库或利用公共数据库进行比对。

1 材料

本实验主要使用以下鉴定试剂盒、

2 方法与结果

采用梅里埃生化鉴定试剂盒对已知菌进行鉴定, 分析并确定鉴定过程中的关键点, 完善鉴定的过程。依据 API 鉴定的流程, 将 API 菌种鉴定方

表 1 鉴定试剂盒信息

序号	名称
1	API 10 S 肠杆菌科和其它非苛养革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒 (比色法)
2	API 20 A 厌氧菌鉴定试剂盒 (比色法)
3	API 20 C AUX 酵母菌鉴定试剂盒 (比色法)
4	API 20 E 肠杆菌和其他非苛养革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒 (比色法)
5	API 20 NE 非苛养非肠道革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒 (比色法)
6	API 20 Strep 链球菌及相关微生物鉴定试剂盒 (比色法)
7	API Candida 酵母菌鉴定试剂盒 (比色法)
8	API Staph 葡萄球菌、微球菌和相关菌属鉴定试剂盒 (比色法)
9	RAPID 20E 肠杆菌和其它非苛养革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒 (比色法)

表 2 试验微生物

序号	实验用菌	序号	实验用菌
1	大肠埃希菌	8	少动鞘氨醇单胞菌
2	粘质沙雷氏菌	9	小肠结肠炎耶尔森菌群 / 弗氏耶尔森菌
3	白色念珠菌	10	浅白隐球酵母
4	生孢梭菌	11	小红酵母
5	金黄色葡萄球菌	12	粘红酵母
6	铜绿假单胞菌	13	腐生葡萄球菌
7	藤黄 / 里拉微球菌	14	少动鞘氨醇单胞菌

表3 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
生化培养箱	Labonco-250BI	上海精宏实验设备有限公司
生物安全柜	BSC-1304 II A2	苏州安泰空气技术有限公司
医用冷藏箱	HYC-650	青岛海尔生物医疗股份有限公司
漩涡混悬仪	WH-3	上海沪西分析仪器厂有限公司

法分为两部分：首先是 API 鉴定盒试剂盒的选择，其次是 API 鉴定。

2.1 生化鉴定

生理生化鉴定是根据微生物对各种生理条件（温度、pH、氧气、渗透压）、生化指标（唯一碳氮源、抗生素、酶等）代谢反应来进行鉴定。API 鉴定是以微生物生化理论为基础，借助微生物信息编码技术的菌种鉴定方法^[2]，主要由 API 试剂条、辅助试剂及结果判读系统组成，可鉴定的细菌大于 800 种。API 鉴定用于细菌鉴定的有 15 个鉴定系列，分别有对应的菌种数据库^[3]。

2.2 API 鉴定试验方法

依据 API 鉴定的流程，将 API 菌种鉴定分为两个步骤^[4]，分别是初筛试验（API 鉴定盒试剂盒的选择）和 API 鉴定。

2.2.1 初筛试验

初筛试验包括革兰氏染色、接触酶试验、氧化酶试验、OF 培养基、M 培养基、凝固酶实验等。初筛试验是最关键的一步，若给出了错误的结果，将影响后续试验，包括微生物鉴定试剂盒和引物等的选用。

试验分析了枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌不同培养时间、不同菌落大小的刮取量染色的情况，得出如下结论：培养时间不足或时间过长会导致部分染色结果介于淡红色和蓝紫色之间，会造成革兰氏染色结果判断不准。

2.2.2 API 鉴定

(1) 试条的准备

准备一个培养盒（盘和盖子），倒入约 5 mL 注射用水于盘的蜂窝小四中，造成一个温室。记录菌株资料于盘的长

边部分（不记在盖上，以免错放）。从包装中取出试条，并放入培养盒中。

(2) 接种物的制备

打开安瓿培养基或悬浮液培养基，用吸管，通过吸取或反复涂抹挑取培养 18~24 h 的新鲜菌落。制成相应浊度的均一菌悬液。菌悬液制备好后应立即使用。或按试剂盒说明书使用。

(3) 试条的接种

将菌液按要求添加至生化管杯中，沿杯壁注入，以免产生气泡，小心注入，盖上盖子，在合适温度孵育对应时间。

(4) 试条的判读

培养一段时间后，判断每个杯内生长状况比较。通过采用观察角度、观察背景，颜色的判别依据对每个生化反应杯的结果进行识别。同时记录于报告单。为了在继续培养时避免污染，仅在判读结果时打开盒盖，并即刻盖回。

鉴定结果可根据说明书的判读表读出，也可参照生化检索手册或鉴定软件，得到鉴定结果。

2.2.3 试验内容

(1) 革兰氏染色试验

试验分析了枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌不同培养时间、不同菌落大小的刮取量染色的情况（见图 1）。

(2) 颜色识别

由于鉴定均在洁净区进行，光线仅为日光灯。试验选取无色盲色弱检验员，比较不同观察背景、观察角度，采用标准色卡进行颜色比对，减少主观影响（见表 4，表 5）。

2.3 试验结果

依据 API 鉴定的流程，初筛试验

中分析革兰氏染色结果判断及微生物形态判断，API 鉴定过程中生化管颜色的判断。

2.3.1 革兰氏染色分析结果

试验分析了枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌不同培养时间、不同菌落大小的刮取量染色的情况。发现染色时，刮取 1 mm 左右大小的新鲜菌落进行染色可以得到染色结果和细菌形态较为明显。

2.3.2 API 鉴定颜色识别结果

试验选取了无色盲色弱人员进行实验，分析不同观察角度、观察背景、同时分析采用比色卡进行颜色判别准确性的影响。在人员无色盲色弱、白色观察背景时，运用比色卡、垂直观察 API 试剂条检查结果，可得到准确的结果。

(1) 颜色观察背景确认

因试验结果在洁净区观察，无自然光，会在日光灯下进行。试验分析白色背景和黑色背景对颜色判断的影响：采用比较了 3 种不同试剂条在白色背景和黑色背景对颜色判断的影响。

试验结果：1、试剂条为白色背景；2、试剂条标识黑色字迹；3、其他颜色背景会对观察结果有干扰。最终确定选用白色背景作为底色。

(2) 颜色观察角度确认

因试验结果在洁净区观察，无自然光，会在日光灯下进行。试验分析俯视和斜视对颜色判断的影响：比较了 3 种不同试剂条在俯视和斜视对颜色判断的影响。

试验结果：比较俯视和斜视的观察效果，斜视不如俯视便利和对颜色判断的直观。采用俯视对试剂条进行颜色判读。

3 讨论

3.1 鉴定结果分析

根据 API 鉴定法结果分析，初筛试验中革兰氏染色，选择刮取 1 mm 左

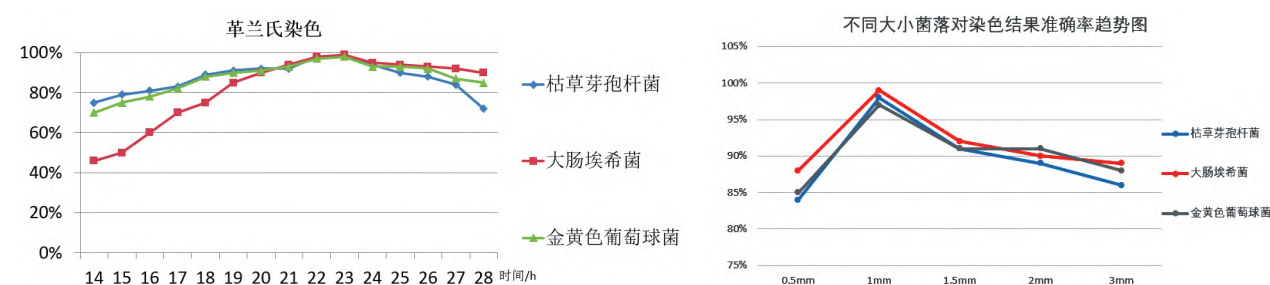


图1 革兰氏染色分析结果

表4 颜色观察背景分析

	白色背景	黑色背景
API 10S	颜色判断清晰、准确	颜色判断有色差
API 20E	颜色判断清晰、准确	颜色判断有色差
RAPID 20E	颜色判断清晰、准确	颜色判断有色差

表5 颜色观察角度确认

	俯视	斜视
API 10S	颜色判断清晰、准确	观察面小、不利于观察
API 20E	颜色判断清晰、准确	观察面小、不利于观察
RAPID 20E	颜色判断清晰、准确	观察面小、不利于观察

右大小的新鲜菌落进行染色可以得到染色结果和细菌形态较为明显。因此可以判断其他的染色方法均可进行相同涂片样品制备。

3.2 初筛试验对鉴定结果的影响^[5]

初筛试验包括纯化、革兰氏染色、接触酶试验、氧化酶试验、OF培养基、M培养基、凝固酶实验等，这些初筛试验决定这些试剂盒的选择，试剂盒检测就是整个鉴定的最后一步。在初筛试验中，首先要保证的是被鉴定菌的纯度，只有被鉴定菌中只有1种菌，没有被其他微生物污染，才能保证之后初筛试验的准确性；其次进行初筛试验时，每个操作步骤要清楚，每个试验结果判断的标准不能混淆；最后初筛试验使用的各种试剂均无误，无污染确保结果准确性。必要时可进行重复试验。

3.3 API鉴定对鉴定结果的影响^[6]

API鉴定时重要的影响因素有菌液的浓度、添加菌液的操作、反应杯结果判断、判读系统的编码计算。菌液的浓度：不同的菌液浓度可能会影

响反应杯的变化，导致结果判断错误，因此使用的菌液浓度需通过比浊管或比浊仪进行浓度确认；添加菌液的操作：对于需要密封环境的反应杯，添加菌液时不能产生气泡，其他的也应尽量不产生气泡；反应杯结果判断：反应杯观察主要为颜色的判断，根据这一步受人为的影响较大，通过改善反应杯观察环境，提高颜色判断的准确性；结果判断系统^[7]的运用：将每3个生化反应分成一组，每组中阳性结果分别标记为1、2、4；将每组数值相加，得到一组编码；数据填入APIweb中，输出反应的结果。在此过程中应确定每组每个位置对应的反应杯结果对应的标记，同时编码计算时应准确。

参考文献

- [1] 中国药典2020版第四部9204微生物鉴定指导原则
- [2] 韩志双，胡凤.API 20E鉴定系统等两种检测方法应用于食品中沙门氏菌的检测结果比较[J].

食品安全导刊，2021(13):40-41. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2021.13.018.

- [3] 苍金荣，张华，王华.梅里埃API 20NE生化鉴定系统在布鲁氏菌鉴定中的局限性[J].现代检验医学杂志，2016，31(04):157-158.
- [4] 王华，苍金荣，归巧娣等.梅里埃API20NE,20E生化鉴定系统在细菌鉴定应用中的局限性[C]//中华医学会，中华医学会微生物学与免疫学分会.中华医学会2014全国微生物学与免疫学学术年会论文汇编.[出版者不详]，2014:2.
- [5] 李文明.肠杆菌科细菌生化鉴定系统的研制及评价[J].世界最新医学信息文摘，2017，17(18):253.
- [6] 戴小波，曾朱君，许坚锋等.API与DL-96微生物鉴定系统在鉴定室内质控菌株中的对比研究[J].国际检验医学杂志，2013,34(11):1437-1439.
- [7] 周赞虎，张永祥，杜鹃等.API 20E对食品中致病微生物检测应用探讨[C]//中国林业与环境促进会.微生物实用技术生态环境应用学术研讨会论文集.[出版者不详]，2008:4.