

两种全自动微生物鉴定系统在布鲁菌鉴定中的应用比较^{*}

徐鸣皋, 丁进亚, 徐娟 (广州军区武汉总医院检验科, 武汉 430070)

摘要:目的 比较 Vitek2 Compact 和 Walkaway 40 全自动微生物鉴定系统在布鲁菌鉴定中的应用。方法 临床分离菌株, 采用 Vitek2 Compact 和 Walkaway 40 全自动微生物鉴定系统进行鉴定, 并将鉴定结果和 16S rRNA 基因序列检测的结果进行比较。结果 临床分离菌株经 Vitek2 Compact GN 鉴定卡鉴定为马耳他布鲁菌, Walkaway 40 NC31 鉴定卡鉴定为动物溃疡威克斯菌、莫拉菌属等。16S rRNA 基因序列分析表明, 该临床分离菌株的 16S rRNA 基因序列与布鲁菌匹配, 排除动物溃疡威克斯菌、莫拉菌属等的可能, 确定该菌株为马耳他布鲁菌。结论 Vitek2 Compact 可以准确的鉴定出布鲁菌, 经 Vitek2 Compact 鉴定为布鲁菌后, 可采用分子生物学方法进行佐证, 大大地提高了布鲁菌的检出率, 降低误诊的可能性。Walkaway 40 无法准确的鉴定出布鲁菌, 误鉴定会导致错误的治疗并使工作人员处于实验室获得性感染的危险之中。建议使用 Walkaway 40 的实验室在鉴定出动物溃疡威克斯菌或莫拉菌属等细菌时应谨慎报告, 并使用 Vitek2 Compact 或分子生物学方法进行复查。

关键词:全自动微生物鉴定系统; 布鲁菌; 鉴定; 16S rRNA 基因序列

中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)04-105-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.030

Comparison of Two Kinds of Automated Microbial Identification System Used in the Identification of *Brucella*

XU Ming-gao, DING Jin-ya, XU Juan (Department of Laboratory Medicine, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** To compare Vitek2 Compact and Walkaway 40 in the identification of *Brucella*. **Methods** Used Vitek2 Compact and Walkaway 40 automated microbial identification system to identify clinical isolates and compared with the detection of 16S rRNA gene sequences analysis. **Results** The clinical isolates was identified as *Bergeyella zoohelcum* or *Moraxella* by Walkaway 40 and as *Brucella melitensis* by Vitek2 Compact. 16S RNA sequence analysis of the isolate, the sequence was identical to the sequences of 16S rRNA of *Brucella*, which excluded the possibility of *B. zoohelam* and *Moraxella*. Determined that the isolate was *B. melitensis*. **Conclusion** Vitek 2 Compact can accurately identified *Brucella*. Use molecular methods to corroborate when the isolates was identified as *Brucella* by Vitek 2 Compact, this method can greatly improve the detection rate of brucellosis and reduce the possibility of misdiagnosis. Walkaway 40 cannot accurately identified *Brucella*. Misidentification of *Brucella* can result in wrong treatment of the patient and let the staff in the risk of laboratory-acquired infection. Recommend laboratory should be cautious reporting in the identified *B. zoohelam* or *Moraxella* by Walkaway 40 and use Vitek2 Compact or molecular methods for review.

Keywords: automated microbial identification system; *brucella*; identification; 16S rRNA gene sequence

随着全自动微生物鉴定系统的普及, 传统手工鉴定细菌的方法逐步淘汰, 大部分微生物实验室使用 Vitek2 Compact 或 Walkaway 40 这两种全自动微生物鉴定系统进行细菌鉴定。布鲁菌为细胞内生长细菌, 其抗生素的选择和普通细菌大相径庭, 误鉴定会导致用药错误, 延误病情, 因此鉴定布鲁菌的准确性就显得尤为重要。我科使用 Vitek 2 Compact 和 Walkaway 40 对一高热患者的血液和骨髓分离菌株进行鉴定, 得到各自不同的结果, 后经军事医学科学院行基因序列分析确定为马耳他布鲁菌, 现报道如下:

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2013 年广州军区武汉总医院无

明显诱因发热患者的血液和骨髓分离菌 1 株。

1.2 仪器及试剂 法国生物梅里埃 Vitek2 Compact (软件版本 5.04), GN 鉴定卡 (批号: 241254040)。质控菌株: 霍氏肠杆菌 ATCC700323, 嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC17666; 德国西门子 Walkaway 40 (软件版本 V3.0), NC31 鉴定卡 (批号: 20120922)。质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.3 菌株分离培养 取阳性血培养瓶中培养液三区划线接种于血琼脂平板和巧克力平板, 分别置于 35℃ 孵箱和 5 ml/dl CO₂ 孵箱孵育。每日观察平板生长状况及菌落形态。

1.4 鉴定 Vitek2 Compact 鉴定时选用 GN 鉴

^{*} 作者简介: 徐鸣皋 (1982—), 男, 本科, 技师, 研究方向: 临床微生物检验, Tel: 13163273392, E-mail: 117242829@qq.com。

定卡, Walkaway 40 鉴定时选用 NC31 鉴定卡。

1.5 16S rRNA 基因检测 送至军事医学科学院进行基因测序。

2 结果

2.1 细菌培养结果 患者血液和骨髓分离菌株经 2 天培养后, 在血琼脂平板和巧克力平板上均形成细小菌落, 革兰染色呈红色短小杆菌, 氧化酶阳性, 动力阴性。

仪器	WalkAway 40		Vitek2 Compact	
	血	骨髓	血	骨髓
鉴定卡	NC31	NC31	GN	GN
生物编码	40000000	40000004	0000001300001001	1000001300001001
鉴定结果	<i>B. zoohelam</i> 74.18%	<i>Moraxella</i> 40.14%	<i>Bruc. melitensis</i> 99%	<i>Bruc. melitensis</i> 98%
	<i>A. lwoffii</i> 23.37%	<i>Q. ureolytica</i> 13.65%		
置信度	低概率的鉴定	低概率的鉴定	极好的鉴定	极好的鉴定
生化反应	URE+	URE+ NIT+	APPA- ProA+ TyrA+	APPA+ ProA+ TyrA+
			URE+ GlyA+ ELLM+	URE+ GlyA+ ELLM+

注: URE: 尿素酶; NIT: 硝酸盐还原; APPA: α-丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶; ProA: L-脯氨酸芳胺酶; TyrA: 酪氨酸芳胺酶; GlyA: 氨基乙酸芳胺酶; ELLM: ELLMAN。

2.3 16S rRNA 基因检测结果 该待检测菌株 16S rRNA 在约 1 530bp 处出现条带, 见图 1。比对结果显示该菌株序列与布鲁菌的 16S rRNA 100% 符合, 确定该菌株为布鲁菌。

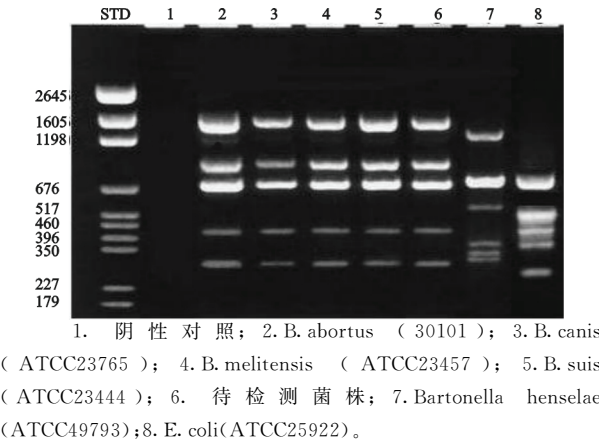


图 1 16S rRNA 基因鉴定

2.4 结果 根据 16S rRNA 基因检测和 Vitek2 Compact 的鉴定结果, 排除动物溃疡威克斯菌、莫拉菌属等的可能, 确定该菌株为马耳他布鲁菌。向临床报告该结果后, 患者回忆曾于一个月前清扫羊圈, 经过院内外专家会诊后确诊为布鲁菌病, 使用多西环素联合复方新诺明治疗后痊愈出院。

3 讨论 布鲁菌病全球分布, 国内多见于内蒙、东北、西北等牧区, 湖北为散发区^[1]。自 1951 年有疫情报告以来一直没有本省疫情报告, 直到 2010 年才报告了本省首例病例^[2]。以往本实验室使用 Walkaway40 和手工方法进行细菌鉴定, 也未有检

2.2 上机鉴定结果 Vitek2 Compact GN 鉴定卡将血液中分离株鉴定为马耳他布鲁菌(99%), 将骨髓分离株鉴定为马耳他布鲁菌(98%); Walkaway 40 NC31 鉴定卡将血液中分离株鉴定为动物溃疡威克斯菌(74.18%)、洛非不动杆菌(23.37%), 将骨髓分离株鉴定为莫拉菌属(40.14%)、动物溃疡威克斯菌(21.86%)、解脲寡源杆菌(13.65%)。鉴定结果见表 1。

出布鲁菌的先例。在引进 Vitek2 Compact 后, 我们对缓慢生长细菌均同时使用 Vitek2 Compact 和 WalkAway 40 进行鉴定, 并将两者鉴定结果不相符的细菌进行 16S rRNA 基因检测, 以此来分析两台全自动微生物鉴定系统的准确度。在这次对比中 Vitek2 Compact 将未知细菌准确的鉴定为马耳他布鲁菌, 且两次鉴定概率均 ≥ 98%, 置信度评价为极好的鉴定, 无论是准确性还是重复性均达到令人满意的程度, 而 Walkaway 40 则鉴定出一个低概率的错误结果。

复习近年来检出布鲁菌的文献报道, 由 Vitek2 Compact 鉴定出的布鲁菌, 都能得到 PCR 或其他方法的证实^[3~7], 证明 Vitek2 Compact 可以准确鉴定出布鲁菌。而未见使用 Walkaway 40 鉴定出布鲁菌的报道。分析全自动微生物鉴定系统的原理可以得知, 全自动微生物鉴定系统通过对鉴定卡中细菌生化反应结果进行读取, 形成一个生物编码, 通过和内置数据库中的生物模型相比较, 从而给出一个和待鉴定细菌生化反应相符或部分相符的细菌鉴定结果。生化反应的相符率, 通过鉴定概率来表示。一旦鉴定卡无法提供鉴定待检菌所需的生化反应, 或者内置数据库中不存在和待检菌相同的生物模型时, 鉴定仪会给出一个错误的结果, 这正是自动化分析系统的局限所在。这一点可以从两种鉴定卡的生化反应结果中得到印证, NC31 鉴定卡仅 URE 和 NIT 阳性, 而 GN 鉴定卡中 APPA, ProA, TyrA, URE, GlyA 和 ELLM 阳

性,这说明 NC31 鉴定卡提供用于检测布鲁菌的生化反应极少,无法满足分辨布鲁菌的需要,故鉴定系统无法在数据库中找到符合的生物模型,从而给出一个部分生化反应相符的低概率结果。而且同一种细菌生化反应不可能是恒定不变的,即使是同一菌株也可能因为传代、药物使用、生长条件、菌液浓度等因素而导致生化反应出现差别。在这次对比中,从患者血液和骨髓分离出的布鲁菌生化结果并不是完全一致,但 Vitek2 Compact 鉴定概率均 $\geq 98\%$,且均准确的鉴定为布鲁菌,即使生化反应不完全相同,但没有将布鲁菌鉴定为其他细菌,或将其他细菌错误鉴定为布鲁菌。显示了 Vitek2 Compact 数据库的完善性,能为布鲁菌鉴定提供足够的数据库支持。而 Walkaway 40 则因为两次生化反应中 NIT 结果的不同而产生不同的鉴定结果,说明 Walkaway 40 不仅无法准确鉴定布鲁菌,而且鉴定的其他缓慢生长细菌结果也应该受到质疑。

通过这次对比,我们发现如果微生物实验室仅使用 Walkaway 40 进行缓慢生长细菌的鉴定,则极易将布鲁菌误鉴定为动物溃疡威克斯菌或其他细菌,通常这样的低概率结果会使用手工方法进行复查,而恰好动物溃疡威克斯菌和布鲁菌一样生长缓慢、氧化酶阳性、动力阴性。缺乏经验的微生物检验人员会想当然的认为动物溃疡威克斯菌就是正确的结果,而忽略了这很可能是从几个错误的结果中选出一个错误的结果。结合这次比较可以得出结论 Vitek2 Compact 鉴定出的马耳他布鲁菌是可靠的,经 Vitek2 Compact 鉴定为马耳他布鲁菌后,可采用分子生物学方法进行佐证^[8],大大地提高了布鲁菌的检出率,降低误诊的可能性。Walkaway 40 无法准确的鉴定出布鲁菌,误鉴定会导致错误的治疗并使工作人员处于实验室获得性感染的危险之中^[9]。同时建议使用 Walkaway 40 的实验室在鉴定出动物溃疡威克斯菌或莫拉菌属等缓慢生长细菌时应谨慎报告,并使用 Vitek2

Compact 或分子生物学方法进行复查。

参考文献:

- [1] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 649-651.
Cui BY. Epidemic surveillance and control of brucellosis in China[J]. Disease Surveillance, 2007, 22(10): 649-651.
- [2] 李翔, 李莉, 程均福, 等. 一例从人体分离的布鲁菌的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12): 1159-1160.
Li X, Li L, Cheng JF, et al. One case of *Brucella* isolated from the human[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(12): 1159-1160.
- [3] Luo L, Zeng ZG, Song YL, et al. Brucellosis in Tarkins, China[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1527-1529.
- [4] 王胜, 王飞, 陈素梅, 等. 羊种布鲁菌血培养阳性1例[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9): 2243.
Wang S, Wang F, Chen SM, et al. One case of *Brucella melitensis* isolated from the blood[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(9): 2243.
- [5] 湛志飞, 张红, 黄一伟, 等. 一例输入性布鲁菌病的病原学诊断[J]. 实用预防医学, 2009, 16(6): 1799-1800.
Zhan ZF, Zhang H, Huang YW, et al. Etiological diagnosis of an imported brucellosis case[J]. Practical Preventive Medicine, 2009, 16(6): 1799-1800.
- [6] 马逸珉, 阮斐怡, 蒋晓飞. 马耳他布鲁菌病一例报道[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 364, 367.
Ma YM, Ruan FY, Jiang XF. One case of brucellosis reported[J]. Laboratory Medicine, 2010, 25(5): 364, 367.
- [7] Dash N, Panigrahi D, Al-Zarouni M, et al. 16S rRNA gene sequence analysis of a *Brucella melitensis* infection misidentified as *Bergeyella zoohelcum*[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2012, 6(3): 283-286.
- [8] Gee JE, De BK, Levett PN, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3649-3654.
- [9] 李建新, 刘小平, 肖平. 临床实验室获得性感染[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 1050-1052.
Li JX, Liu XP, Xiao P. Laboratory-acquired infections[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(11): 1050-1052.