

微生物 快速诊断 新技术

程知义 周佳敏 编著

上海科学技术文献出版社



微生物快速诊检新技术

程 知 义 编著
周 佳 敏

上海科学技术文献出版社

微生物快速诊断新技术

程知义 编著
周佳敏

*

上海科学技术文献出版社出版
(上海市武康路2号)

新华书店上海发行所发行
江苏常熟梅李印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 9.75 字数 235,000

1984年2月第1版 1984年2月第1次印刷

印数: 1—8,000

书号: 13192·55 定价: 1.20 元

《科技新书目》60-266

序

近十多年来,随着近代科学技术的迅速发展,微生物诊检技术也取得了极大的进展。它已迈进了自动化、电子计算机化的新时期。由于数学、物理学和生物化学等已渗入到微生物学的各个领域,微生物诊检技术的快速性、精确性和敏感性等方面,得到了极大的提高,为微生物快速诊检技术展示了光明的前景。我们从大量最新资料,特别是有关专题的多次国际学术会议的论文汇编中选出一些已经付诸实际应用的和具有发展前途的新技术,如气相色谱技术、放射测量法、阻抗测量法、微量量热法、生物发光法、放射免疫测定法、酶联免疫吸附测定法、对流免疫电泳、药敏自动测定技术、电子计算机鉴定法、自动微生物诊检仪和简易诊检系统等,编写成册,供从事有关工作的科研,专业人员和大专院校师生参考。希望它对实现我国微生物学技术的现代化有一点参考价值。

由于我们的专业知识有限,又缺少实践经验,书中疏漏和错误在所难免,望读者批评指正。

编 者

1981年9月

0574207-8479/30 — 1.20元

目 录

第一章 微生物快速诊检技术的进展	(1)
一、引言	(1)
二、几种有希望的新技术	(2)
(一)物理化学方法	(2)
(二)免疫学方法	(3)
(三)其他方法	(4)
三、新技术发展的特点	(6)
参考文献	(6)
第二章 气相色谱技术	(8)
一、引言	(8)
二、气相色谱仪	(10)
(一)基本部件	(10)
(二)辅助部件	(14)
三、微生物气相色谱的分析方法	(16)
(一)微生物细胞化学成分的分析	(16)
(二)微生物代谢产物的分析	(21)
(三)微生物的底物降解产物的分析	(24)
(四)气相色谱数据的分析	(25)
四、气相色谱技术在微生物学中的应用	(27)
(一)微生物的分类和检定	(27)
(二)传染病的诊断	(31)
五、气相色谱技术的优缺点	(39)
参考文献	(40)

• • •

第三章 放射测量法	(44)
一、放射测量法的原理	(44)
二、仪器和操作方法	(45)
(一)闪烁计数器测量法	(45)
(二)电离室测量法	(46)
三、影响测量结果的因素	(49)
四、放射测量法在微生物诊检工作中的应用	(50)
(一)菌血症的快速诊断	(50)
(二)菌尿症的快速诊断	(54)
(三)食物和水中细菌的检查	(55)
(四)菌种鉴定	(56)
(五)抗菌素敏感性测定	(58)
(六)血清氨基糖苷浓度的测定	(60)
(七)细菌代谢的研究	(61)
五、放射测量法的优缺点	(62)
参考文献	(63)
第四章 阻抗测量法	(66)
一、阻抗测量法的理论基础	(66)
二、阻抗测量仪器	(67)
三、影响阻抗测量法的因素	(73)
(一)电极的性质及其表面的物理状态	(73)
(二)培养基的特性	(74)
(三)培养物生长的特性	(74)
四、阻抗测量法的优缺点	(75)
五、阻抗测量法的研究近况	(77)
(一)微生物的表征和检定	(77)
(二)临床标本的快速诊检	(82)
(三)抗菌素敏感性的快速测定	(87)

(四)红细胞溶解作用的检测.....	(88)
参考文献	(90)
第五章 微量量热法	(92)
一、仪器设备及其操作方法	(93)
二、微量量热法的实验研究	(95)
(一)热曲线图的可重复性试验.....	(95)
(二)鉴定能力的改进实验.....	(97)
三、微量量热法初步应用的研究	(101)
(一)临床标本的诊检.....	(101)
(二)药物敏感性的测定.....	(102)
(三)血培基中最适成分的评价.....	(103)
参考文献	(104)
第六章 生物发光法	(106)
一、基本原理	(106)
二、仪器装置	(107)
三、实验研究	(110)
(一)菌尿症快速诊检的研究.....	(110)
(二)血培养物快速检测的研究.....	(112)
(三)抗菌素敏感性快速测定的研究.....	(113)
(四)环境污染快速检测的研究.....	(114)
四、化学发光法	(115)
参考文献	(116)
第七章 放射免疫测定法	(119)
一、基本原理	(120)
二、测定方法	(122)
(一)标记技术.....	(123)
(二)抗血清的制备.....	(127)
(三)保温.....	(127)

(四)分离.....	(123)
(五)标准曲线的制作.....	(132)
(六)固相免疫吸附剂的制备.....	(135)
三、对放射免疫测定法的评价	(137)
(一)敏感性.....	(138)
(二)精确性.....	(141)
(三)特异性.....	(142)
四、放射免疫测定技术在微生物学中的应用	(144)
(一)病毒.....	(144)
(二)细菌毒素.....	(147)
(三)细菌和真菌.....	(149)
(四)其他.....	(150)
参考文献	(151)
第八章 酶联免疫吸附测定法	(155)
一、原理	(155)
二、试验材料	(160)
三、操作程序	(165)
(一)酶标记抗体的制备.....	(166)
(二)酶标抗体的分离和检定.....	(168)
(三)载体的包被.....	(169)
(四)结果判断.....	(171)
(五)具体操作举例.....	(172)
四、ELISA 在微生物学中的应用.....	(173)
(一)病毒抗原的检测.....	(173)
(二)病毒和细菌抗体的滴定.....	(179)
(三)细菌抗原和细菌毒素的检出和鉴定.....	(182)
(四)其他.....	(184)
五、展望	(184)

参考文献	(185)
第九章 对流免疫电泳	(192)
一、原理	(192)
二、技术条件	(194)
三、影响 CIE 结果的因素	(196)
四、CIE 在微生物学中的应用	(201)
(一) CIE 用于传染病的快速诊断	(201)
(二) 微生物的分型和鉴定	(207)
(三) 体液内抗原的可能发病意义	(208)
五、方法的优缺点	(209)
参考文献	(210)
第十章 药敏自动测定技术	(214)
一、仪器的构造、原理及其使用方法	(215)
(一) Autobac 1	(216)
(二) MS-2	(222)
(三) Autobac 1 和 MS-2 性能的比较	(224)
二、药敏自动测定技术的实际应用	(226)
(一) 抗菌药物敏感性的快速测定	(226)
(二) 细菌的快速鉴定	(230)
(三) 菌尿症的初筛和其它	(234)
参考文献	(235)
第十一章 微生物的电子计算机鉴定法	(238)
一、电子数字计算机	(239)
(一) 计算机的基本构造	(239)
(二) 计算机的程序编制	(241)
二、采用计算机技术进行细菌鉴定	(242)
(一) 概率最大近似值模型法	(242)
(二) 检索法	(248)

(三)判别分析法	(248)
(四)最近邻分析法	(250)
三、微生物计算机鉴定法的应用	(250)
四、计算机在微生物学中的其他用途	(252)
参考文献	(253)
第十二章 自动微生物诊检仪——AMS	(256)
一、AMS 及其使用	(257)
二、AMS 的实验研究	(260)
(一)肉汤培养基的选择	(260)
(二)AMS 性能的研究	(260)
三、AMS 用于临床尿液标本诊检的评价	(265)
(一)尿液标本诊检的评价	(265)
(二)尿液标本计数的评价	(266)
四、AMS 用于肠杆菌科细菌的检定	(268)
五、AMS 的优越性及其存在的问题	(269)
参考文献	(270)
第十三章 简易诊检系统	(271)
一、引言	(271)
二、几种简易诊检系统	(272)
(一)Enterotube(Roche)	(272)
(二)R/B 系统(Diagnostic Research)	(273)
(三)API-20E 系统(Analytab Products Inc.)	(274)
(四)Minitak 系统(BBL)	(275)
(五)Patho Tec 系统(General Diagnostics)	(279)
(六)Micro-ID 系统(General Diagnostics)	(280)
三、几种简易诊检系统的评价	(283)
四、展望	(284)
参考文献	(284)
附录	(288)

第一章 微生物快速 诊检技术的进展

一、引言

长期以来,微生物学技术基本上都是以巴斯德、柯赫等所倡用的纯培养概念为指导思想进行研究。即使到了七十年代初期,微生物学工作者们在研究和发展微生物学技术的全过程中,无论是手操作、机械化或自动化的方法,始终是围绕着纯培养概念的圈子进行的。20年前出现的直接荧光抗体法和气液色谱法即已开始探索着研究摆脱纯培养概念的微生物诊检技术的新路子新方法。约于1973年前后,偶然发现作为航天技术中“副产品”的一台自动化仪器,能够定量测定出尿液标本中的细菌。该仪器还可对尿液标本中一些常见的致病菌提供鉴定至属甚至种的初步数据。由此,免疫学、生化学分析以及结合电子学和微型计算机,检测微生物生长或不生长谱型的独特的方法,为我们突破纯培养概念提供了一些可用的新方法。

经过近十多年来的努力,在微生物诊检新技术方面出现了前所未有的大好局面,主要表现在:一物多用的自动化仪器有所增多;新的、改进的免疫学和血清学方法不断出现;体液分析技术进展迅速,不仅作为一种快速诊断方法,而且还可适用于若干重要病原体的抗菌素浓度的测定;甚至在传统的纯培养方法的应用方面也取得许多改进,为快速诊断工作提供了多种实用的方法。

• 1 •

二、几种有希望的新技术

(一) 物理化学方法

在物理化学方法中，以气相色谱技术和放射测量法研究得比较成熟，积累有较丰富的资料，且已在许多实验室中被列为常规。其他方法如阻抗法、生物发光法等则均是很有希望的微生物快速诊断方法。

1. 气相色谱技术(GC)

此法以微生物自身的化学组成或其代谢或分解产物作为诊断依据。对分枝杆菌、化脓性链球菌、奈瑟氏球菌、霍乱弧菌、类杆菌以及其它革兰氏阴性杆菌等有较多研究，其中以分枝杆菌成绩最为明显。可用此法鉴别结核杆菌的抗药株和敏感株，牛型结核杆菌卡介苗株和人型结核杆菌以及光滑型和粗糙型的分枝杆菌。在进行传染病诊断时，只要临床标本中含有毫微克至微微克含量的病原菌的独特代谢产物，此法即可迅速作出诊断。此法已在厌氧菌感染和脑膜炎的快速诊断工作中取得显著的成绩。

2. 放射测量法(RM)

微生物利用培养基中含有的 ^{14}C -底物，代谢成 $^{14}\text{CO}_2$ ，通过测量培养基中放射性强度的增长与否，以确定标本中有无细菌的存在。由于自动放射测量仪 Bactec 的问世，使此法操作更为简便。此法目前可用于监测、检查血培养中微生物的生长、无菌试验、致病性奈瑟氏球菌的鉴定、分枝杆菌的检测和药敏试验。在进行血培养的工作中，它的阳性检出率虽和常规法相等或略高，然而其检出时间则比常规法要快速得多。此法还可用于食物和水中细菌的快速检测以及菌尿症的快速诊断等方面。

3. 阻抗测量法

微生物可把培养基中的电惰性底物代谢成电活性产物，从而使培养基的电导性增大，培养物的阻抗则由之而降低。不同微生物在培养基中可产生具有作为诊检依据的特征性阻抗曲线（阻抗对时间）。自动阻抗测量仪 Bactometer 32 型一次可检测 32 份标本，仪器结构简单，操作方便并有极佳的重复性。此法已被试用于微生物的鉴定、菌血症和菌尿症的快速诊断和药敏试验的研究中，取得初步成绩。当培养基内含有 $10^4 \sim 10^5$ 个菌/毫升时，此法于 2~3 小时内即可检出。

4. 生物发光法

由于三磷酸腺苷(ATP)普遍存在于一切活细胞内，而每种微生物所含 ATP 的浓度都有一狭窄的范围，因此可被利用来作为诊断的依据。此法具有测定约 10^{-14} 克分子浓度的 ATP，约相当于每毫升不超过 10 个细菌的含量。此法既可采用高度灵敏的光度计自动测量，也可使用液体闪烁器进行手操作测量。此法作为菌尿症的初筛方法已取得令人鼓舞的结果。当尿液标本中含有 10^5 个菌/毫升时，只需 20~60 分钟即可得出结果。

(二) 免疫学方法

迅速发展的免疫学和血清学方法具有高度敏感和特异的特点，如放射免疫测定法、酶联免疫吸附试验和对流免疫电泳等法，正被日益应用于抗体或抗原的检测。免疫荧光技术继续得到改进，现可采用荧光测量法作免疫荧光的定量测定。此外，协同凝集试验、胶乳凝集反应等也有较大的改进或进展。

1. 放射免疫测定法(RIA)

此法系利用放射性同位素测定法和免疫反应的基本原理相互结合的一种技术；具有 RIA 法的高度敏感性——可测至微微

克的水平,又有免疫反应的特异性。经典的 RIA 是以标记抗原和未标记抗原竞争限量的抗体。因此,又称竞争性 RIA^④。在微生物诊检工作中应用较多的固相 RIA, 操作简便, 且适于自动化, 但其精确性和敏感性则稍次于竞争法。目前, RIA 已广泛应用于细菌和病毒抗原的分析、抗体测定、急性传染病的早期或快速诊断、污染食物中细菌毒素的检测、各种免疫球蛋白和血清蛋白的定量测定、肿瘤相关抗原的检测等项工作中。

2. 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)

利用可溶性抗原或抗体吸附或共价结合于固相载体上, 待与未知抗体或抗原作用后, 加以酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或半乳糖苷酶等)标记的抗体或抗原作为指示物进行定量测定。此法敏感性仅次于 RIA, 可测至毫微克至微微克; 特异性强, 重复性好, 适用范围宽广。此法已在病毒和细菌抗原和抗体、寄生虫抗体、过敏原、肿瘤相关抗原以及各类免疫球蛋白等的检测上广泛应用。

(三) 其他方法

近几年中, 研究较多的还有自动化检测仪器和简易诊检系统两类方法。前者有自动微生物诊检仪、Autobac 和 MS-2 型药敏自动测定仪等, 后者则包括利用各种生化学底物进行微生物鉴定的多种简易检测系统, 如 API-20、Micro-ID 以及新近问世的供特定致病菌用的简易检测系统如 Phadebact (Pharmacia 厂) 和 Streptex (Wellcome 厂); 两者均系供链球菌快速检测之用; 前者利用协同凝集试验原理, 而后者则系胶乳凝集原理。近年来微生物诊检技术发展的过程中, 还有一点值得提出的是电子计算机技术的应用。电子计算机的应用帮助了微生物学工作者对大数量错综复杂和变化万端的实验数据可迅速作出精确

的分析。同时,精密的诊检仪器或是简易的检测系统结合电子计算机的使用,可使微生物的诊断和鉴定的效果得到极大的提高。事实上,电子计算机技术已在微生物诊检仪器的自动控制、实验数据的处理、菌种保存和微生物分类等多方面的工作中,取得了明显的成绩。

1. 自动微生物诊检仪(AMS)^[10]

AMS是在近年来各种自动化、电子计算机化的微生物诊检仪器的基础上发展起来的一组综合性装置。它可单独或同时连续进行多种试验目的的新型仪器。AMS的生物学基础在于,利用可任意处理的塑料容器中含有对某些特定细菌或菌群有高度选择性的干燥培养基;监测培养基中菌量变化和鉴定结果的光学系统,以及通过计算机作出最终的判定。AMS可于4~13小时内对临床尿液标本中最常见的绿脓杆菌等9种微生物作出定量测定和鉴定,还可于12小时内获得这些微生物的药敏结果。

2. 药敏自动测定仪^[11~13]

Autobac(Pfizer厂)和MS-2(Abbott厂)自动药敏测定装置的研制成功,是近年来微生物技术自动化发展的典型范例之一。它们均系根据光散射原理制成。试验时,仪器自动对各容器中生长的细菌进行测定,印出各试验和对照容器中细菌浓度的比值,把它们转换成与标准药敏试验相当的结果:敏感、中度敏感或抗药。仪器一次可测定32株细菌分别对12~18种不同抗菌药物的药敏结果,3~6小时内可以完成。仪器具有多用途的特点,它们可用于大规模的菌尿症筛选试验,利用二次鉴别函数计算机程序分析方法,进行细菌和酵母菌的快速鉴定。MS-2型不同于Autobac型在于它系全自动化和具有连续测定的能力,故可进行微生物生长动力学研究;MS-2还附有一研究系统,可供进行微生物学研究之用。

三、新技术发展的特点

综观最近涌现出来的各种新技术，它们具有以下几个共同的特点。

第一，摆脱了传统的纯培养概念的束缚，这是微生物诊断新技术得以发展的最为重要的特点。它表现在许多新技术打破了传统的形态学、生化反应和血清学方法的旧框框，绕过了繁琐费时的纯培养操作，甚至直接用标本进行诊检、计数和药敏等试验，从而简化了操作程序、达到了快速诊检的目的。

其次，新技术均以结合精确性、快速性、敏感性和自动化为发展的方向。就检出时间而论，一些新技术已将传统方法的以日计算，缩短到以时计算，最快速的方法甚至只需1小时左右即可获得结果，精确性均可达到常规方法的90%以上；自动化也可达到半自动直至全自动的程度；至于敏感性，最高的可达毫克至微微克（约相当于一个细菌或其产物）的水平。

第三，一法多用或一机多用。这一特点在以物理化学理论为基础的新技术中最为明显。它们几乎多能同时供微生物诊检、计数、药敏测定等多种试验之用。

第四，电子计算机与新技术相结合。电子计算机的渗入，大大有助于新技术中产生的大量实验数据的快速运算、分析和储存，从而为提高诊检工作的精确性、快速性、敏感性和自动化创造了极为有利的条件。这不仅反映在使用复杂的精密仪器上，而且，即使在用简易诊检系统时也复如此。

参 考 文 献

1. Mitruka, B. M. & Alexander, M.: Rapid and sensitive detection of bacteria

- by gas chromatography. *Appl. Microbiol.* 16: 636, 1968.
2. Mitraka, B. M. (ed) *Gas Chromatographic Applications in Microbiology and Medicine*. John Wiley & Sons, New York, 1975.
 3. Deland, F. H. & Wagner, H. N. Jr. : Automated radiometric detection of bacterial growth in blood cultures. *J. Lab. Clin. Med.* 75: 529, 1970.
 4. Hadley, W. K. & Senyk, G. : Early detection of microbial metabolism and growth by measurement of electrical impedance. In Schlessinger, D. (ed) : *Microbiology - 1975*. p. 12. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1975.
 5. Alexander, D. N. et al: Evaluation of adenosine 5'-triphosphate assay as a screening method to detect significant bacteriuria. *J. Clin. Microbiol.* 3: 42, 1976.
 6. Tilton, R. C. (ed) : *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1981.
 7. Skelly, D. S. et al: Radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 19: 146, 1973.
 8. Wisdom, G. B.: Enzyme-immunoassay. *ibid* 22: 1243, 1976.
 9. Wellstood, S.: Evaluation of phadebaect and streptex kits for rapid grouping of streptococci directly from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 15: 226, 1982.
 10. Nicholson, D. P. & Koepke, J. A.: The antimicrobial system for urine. *ibid* 10: 823, 1979.
 11. Praglin, J. et al: Autobac 1-A 3-hour, automated antimicrobial susceptibility system. 1. System description. In Heden, C. G. & Illeni, T. (ed). *Automation in Microbiology and Immunology*. p. 197, 1975.
 12. McKie, J. E. Jr.: Autobac 1-A 3-hour, automated antimicrobial susceptibility system. 2. Microbiological studies. *ibid* p. 209, 1975.
 13. Spencer, H. J. et al: Automated antibiotic susceptibility testing with the MS-2 system. In Johnston, H. H. & Newsom, S. W. B. (ed) : *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. p. 272, 1976.