

概率在肠杆菌科菌属鉴定中的应用

冯日孝

(四川省德阳市卫生防疫站)

作者应用概率原理,使传统的定性鉴定细菌的方法数值化,增加了鉴定结果的把握性。根据十项生化试验结果,对肠杆菌科作出属的鉴定,效果较满意,现介绍如下。

(一) 基本原理

某随机事件(现象、实验结果)在重复多次的条件下,该事件发生的可能性或发生率即概率(P),用数值表达介于0—1之间。 P 越接近1,可能性越大,越接近0,可能性越小。所以,根据某菌株生化试验的 P 值大小即可判断。然而,肠杆菌科不止两个菌属,也不能单凭一项试验就作出判断。因此,要应用概率的乘法定理计算出组合概率(同时发生的概率),然后进行判断。

1. 模型实验概率表的编制: 本文设计了一个10项生化特性的实验系列,并根据 Edwards 等的资料编制概率表(见表1)。表中数值是阳性概率($P_{\text{阳}}$),某项试验呈阳性时,直接引用表中

数值,若呈阴性时则以 $1-P_{\text{阳}}$ 求得该项试验结果之概率值。

2. 概率的乘法定理: $E_1 \cdots \cdots E_n$ (互相独立)事件的组合概率(CP_i)是各别概率 $P_1 \cdots \cdots P_n$ 的乘积^[1]。

$$P(E_1 \cdots \cdots E_n) = \prod_{i=1}^n P(E_i)$$

简记为 CP_i (1)

设未知菌(即待鉴定菌)6项试验结果,再从表1中查出各项概率值后计算出 CP_i ,根据 CP_i 大小作出判断(见表2)。

表2中各分类单位6项实验的概率相乘,即得各分类单位的 CP_i ,如大肠艾希氏菌的 $CP_i = 0.393$,发碱殊异菌的 $CP_i = 8.73 \times 10^{-4}$ 等。若以大肠艾希氏菌和发碱殊异菌进行比较,则未知菌为大肠艾希氏菌的可能性较发碱殊异菌大400多倍。

本文在原工作单位绵阳地区卫生防疫站完成。

表 1 模型实验的概率值

分类单位	阳 性 概 率 ($P_{\text{阳}}$)									
	脲基质	硫化氢	脲酶	动力	葡萄糖产气	乳糖	甘露醇	蔗糖	苯丙氨酸	赖氨酸
大肠艾希氏菌	0.99	0.01	0.01	0.70	0.90	0.90	0.96	0.50	0.01	0.90
发碱殊异菌	0.99	0.01	0.01	0.01	0.01	0.10	0.99	0.10	0.01	0.60
志贺氏 A 群 II 型	0.99	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
志贺氏 B、C 群	0.40	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.90	0.01	0.01	0.01
志贺氏 D 群	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.99	0.01	0.01	0.01
爱德华菌属	0.99	0.99	0.01	0.99	0.99	0.01	0.01	0.01	0.01	0.99
伤寒沙门氏菌	0.01	0.94	0.01	0.99	0.01	0.01	0.99	0.01	0.01	0.99
沙门氏菌属	0.01	0.90	0.01	0.95	0.90	0.01	0.99	0.01	0.01	0.95
亚利桑那菌	0.01	0.99	0.01	0.99	0.99	0.60	0.99	0.05	0.01	0.99
枸橼酸菌属	0.07	0.80	0.70	0.95	0.90	0.40	0.99	0.20	0.01	0.01
肺炎克雷伯氏菌	0.06	0.01	0.95	0.01	0.97	0.99	0.99	0.99	0.01	0.97
阴沟肠杆菌	0.01	0.01	0.95	0.95	0.99	0.95	0.99	0.97	0.01	0.01
哈夫尼亚菌属	0.01	0.01	0.01	0.93	0.99	0.01	0.99	0.10	0.01	0.99
沙雷氏菌属	0.01	0.01	0.30	0.99	0.50	0.01	0.99	0.99	0.03	0.99
变形杆菌属	0.99	0.95	0.95	0.95	0.90	0.01	0.01	0.90	0.99	0.01
摩根氏菌属	0.99	0.01	0.99	0.90	0.85	0.01	0.01	0.01	0.95	0.01
雷极氏菌属	0.99	0.01	0.99	0.90	0.12	0.10	0.90	0.13	0.99	0.01
普洛菲登斯菌属	0.99	0.01	0.01	0.97	0.85	0.01	0.01	0.13	0.97	0.01

表 2 未知菌六项试验结果的概率

分类单位	脲基质 (+)	H ₂ S (-)	脲酶 (-)	乳糖 (+)	蔗糖 (-)	葡萄糖产气 (+)	CP _i
大肠艾希氏菌	0.99	0.99	0.99	0.90	0.50	0.90	0.393
发碱殊异菌	0.99	0.99	0.99	0.10	0.90	0.01	8.73×10 ⁻⁴
...
...

(二) 鉴定程序和方法

1. 接种: 将未知菌的纯培养物接种于 VP 试验培养基、亚硝酸钠试验培养基和模型实验所列的 10 项生化鉴别培养基上, 观察并记录结果, 同时作氧化酶试验和革兰氏染色镜检。

2. 菌族的鉴定: 根据苯丙氨酸酶、VP 和亚硝酸钠试验的反应结果。对未知菌作出了族的鉴定^[2](见表 3)。

表 3 肠杆菌科菌族的鉴别

试验项目	艾希氏菌族	克雷伯氏菌族	变形杆菌族
苯丙氨酸酶	-	-	+
VP 试验	-	+	-/(+)
亚硝酸钠试验	-(+)	+	+

把表 2 中的大肠艾希氏菌至枸橼酸杆菌属归为艾希氏菌族, 从肺炎克雷伯氏菌至沙雷氏菌属归为克雷伯氏菌族, 其余归为变形杆菌族。

3. 菌属的鉴定: 根据未知菌的 10 项生化反应结果查表 2, 列出未知菌所在菌族中各分类单位各项试验的概率值, 然后计算 CP_i 和鉴定值, 根据鉴定值大小作出属的鉴定。

鉴定值是未知菌所在菌族中各分类单位组合概率与全部分类单位组合概率相加之和 ($\sum CP_i$) 的比值。

$$CP_1 + \dots + CP_n = \sum_{i=1}^n CP_i$$

$$\text{简记为 } \sum CP_i \quad (2)$$

$$\text{鉴定值} = CP_i / \sum CP_i = (1)/(2) \quad (3)$$

4. 判断标准:

表 4 补充生化试验及反应情况

试 验	发碱殊异菌	志贺氏菌	沙门氏菌	亚利桑那菌	枸橼酸菌
醋 酸 钠	+	-
葡萄糖铵	+	-
丙二酸钠	-	+	d
卫 矛 醇	+	-	d
亚砷酸钠*	-	-	+

“+”: 阳性 “-”: 阴性 “d”: 反应不定 * 参照族的鉴定

(1) 某分类单位鉴定值 ≥ 0.90 时, 可判定未知菌即系该分类单位成员。

(2) 同一菌属中两个不同亚属(群或种)之鉴定值相加 > 0.90 者, 对未知菌可作出属的判定。

(3) 不符合上述标准时, 对鉴定值较大的两个分类单位进一步作补充生化试验(见表 4)和血清学玻片凝集试验, 然后根据试验结果作出判定。

5. 鉴定实例: 未知菌 A、B、C 试验结果系艾希氏菌族成员。A、B 两菌株可排除艾希氏菌属和志贺氏菌属; 菌株 C 可排除爱德华氏菌属、沙门氏菌属和枸橼酸杆菌属。排除的菌属可不予计算其概率, 以减少工作量, 即使计算其概率值也必然很小。未知菌 A、B、C 的鉴定结果见表 5。

(1) 菌株 A $\sum CP_i = 0.535$, 亚利桑那菌鉴定值为 0.983。符合第一条标准, 故未知菌 A

表 5 菌株 A、B、C 鉴定实例

分类单位	实 验 结 果 和 概 率										组合概率	鉴定值
	靛基质	H ₂ S	脲酶	动力	葡萄糖产酸	乳糖	甘露醇	蔗糖	苯丙氨酸	赖氨酸		
菌株 A	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
爱德华氏菌	0.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.01	0.01	0.99	0.99	0.99	9.32×10^{-7}	1.74×10^{-6}
伤寒沙门氏菌	0.99	0.94	0.99	0.99	0.01	0.01	0.99	0.99	0.99	0.99	8.76×10^{-3}	1.64×10^{-4}
沙门氏菌	0.99	0.90	0.99	0.95	0.90	0.01	0.99	0.99	0.99	0.95	6.95×10^{-3}	1.29×10^{-3}
亚利桑那菌	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.60	0.99	0.95	0.99	0.99	0.526	0.983
枸橼酸杆菌	0.93	0.80	0.99	0.95	0.90	0.40	0.99	0.80	0.99	0.01	1.98×10^{-3}	3.70×10^{-3}
菌株 B	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+		
爱德华氏菌	0.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.01	0.99	0.99	0.99	9.23×10^{-3}	8.74×10^{-3}
伤寒沙门氏菌	0.99	0.94	0.99	0.99	0.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	8.67×10^{-3}	8.26×10^{-3}
沙门氏菌	0.99	0.90	0.99	0.95	0.90	0.99	0.99	0.99	0.99	0.95	0.688	0.655
亚利桑那菌	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.40	0.99	0.95	0.99	0.99	0.351	0.334
枸橼酸杆菌	0.93	0.80	0.99	0.95	0.90	0.60	0.99	0.80	0.99	0.01	2.96×10^{-3}	2.82×10^{-3}
菌株 C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
大肠艾希氏菌	0.99	0.99	0.99	0.30	0.10	0.10	0.04	0.50	0.99	0.90	5.19×10^{-3}	3.71×10^{-3}
发碱殊异菌	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.90	0.01	0.90	0.99	0.60	4.58×10^{-3}	0.327
志贺氏 A 群 II 型	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.01	9.14×10^{-3}	0.653
志贺氏 B、C 群	0.40	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.10	0.99	0.99	0.01	3.73×10^{-4}	2.66×10^{-2}
志贺氏 D 群	0.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.01	0.99	0.99	0.01	9.32×10^{-7}	6.66×10^{-3}

应鉴定为亚利桑那菌。

(2) 菌株 B $\sum CP_i = 1.05$, 沙门氏菌和亚利桑那菌鉴定值之和为 0.989, 符合第 2 条标准, 可鉴定为沙门氏菌属。

(3) 菌株 C $\sum CP_i = 0.0141$, 各分类单位鉴定值计算结果均 < 0.90 , 又不符合第 2 条标准, 按第 3 条标准应在志贺氏 A 群 II 型和发碱殊异菌之间作补充试验。结果醋酸钠、葡萄糖

表 6 100 株细菌鉴定情况

常规鉴定结果	一步完成鉴定				两步完成鉴定*			
	典型菌株		非典型菌株		典型菌株		非典型菌株	
	株	%	株	%	株	%	株	%
大肠艾希氏菌	0	0	9	9.0	0	0	1	1.0
发碱殊异菌	1	1.0	0	0	0	0	0	0
志贺氏 A 群 II 型	1	1.0	0	0	0	0	0	0
志贺氏 B 群	14	14.0	0	0	0	0	0	0
志贺氏 D 群	1	1.0	0	0	0	0	0	0
伤寒沙门氏菌	4	4.0	0	0	0	0	0	0
沙门氏菌属	22	22.0	0	0	0	0	10	10.0
亚利桑那菌	17	17.0	0	0	0	0	0	0
枸橼酸杆菌	14	14.0	1	1.0	0	0	5	5.0
合 计	74	74.0	10	10.0	0	0	16	16.0

* 补充生化试验和血清学玻片凝集试验

铵均阳性,故鉴定为发碱殊异菌。

(三) 实际应用结果

为考核本法的实际效果,将常规鉴定符合肠杆菌科各菌属定义的 100 株细菌,再按本法鉴定,有 84% 的菌株一步完成了鉴定。16% 的非典型菌株在补充试验后完成了鉴定,与常规法鉴定结果均一致(见表 6)。

(四) 讨论和小结

肠杆菌科的鉴定主要依据生化试验结果作出判断。由于试验项目较多,对反应不典型的菌株常使鉴定发生困难。根据概率原理把定性结果数值化,使多个判断指标综合为一个直观的数据,据此进行鉴定,给鉴定工作带来了很大的方便,减少了盲目性,一般检验人员很容易掌握。据报道^[1], Lapage 等对 50 项试验的概率用电子计算机进行运算,可将 62 种细菌鉴定到种一级。本文方法仅对 10 项试验的概率用一般的计算工具运算,即可将肠杆菌科鉴定到属或种,从而利于基层单位推广应用。

日常工作中非典型菌株的鉴定比较困难,尤其是经验不足的检验人员更是如此。本文方法可能是解决非典型菌株鉴定的一个有效手

段。实际应用结果,10% 的非典型菌株(主要是大肠艾希氏菌)在第一步程序完成后即作出鉴定,仅 16% 的非典型菌株(主要是沙门氏菌和枸橼酸杆菌)作 2—3 项补充试验后即完成了鉴定,虽不能立即判定,但根据概率大小,鉴定范围已缩小在两个菌属之内,针对性更强了。

值得指出,艾希氏菌属中的发碱殊异菌的性质和志贺氏菌极其相似,某些菌株且有抗原关联,易于判断失误,故将其列为一个分类单位参予鉴定。同理,把亚利桑那菌(即沙门氏菌属亚属 III)列为一个分类单位,并非赞同这样的分类方法。

由于条件限制,在实际考核中未能对克雷伯氏和变形杆菌两个菌族菌株进行验证,但作者相信通过苯丙氨酸酶、VP、亚砷酸钠和脲酶等 4 项实验结果,判别它们将不会发生困难。

本文推荐的方法和程序着重于肠杆菌科内菌属的鉴定,由于缺少有关资料,未能将耶尔森氏菌属列为分类单位参予鉴定,故有待补充。

参 考 文 献

- [1] 黄子卿: 化学通报, 1: 52, 1978.
- [2] 何晓青: 微生物学通报, 7: 267, 1980.
- [3] 李 钦: 微生物学通报, 6: 25, 1979.