

## 微生物基因分型鉴定系统



## 背景:

分子生物学技术在近几年的迅速发展和普及，使得微生物学鉴定得以摆脱传统生化鉴定方法的局限，跨入新的历史进程。较上世纪已经出现的生化鉴定法，基于分子生物学技术的微生物鉴定系统的优越性主要表现为：可鉴定的种属范围均大大扩展；可靠性和灵敏度显著提升；整体检测时间降低。ThermoFisher 公司的MicroSEQ®自动微生物基因分型鉴定系统分型系统是目前技术最为成熟、应用最为广泛的基因分析鉴定系统，现已广泛应用在药品、食品及工业微生物的鉴定分析上，以下内容将对这一系统做更为全面的介绍。

## 2015 版药典中指出，测序是微生物鉴定的最终解释方法

### 2015版药典四部：测序是微生物鉴定的最终解释方法

#### 9204 微生物鉴定指导原则

本指导原则为非无菌药品微生物限度控制菌检查中疑似菌的鉴定，以及药物原料、辅料、制药用水、中间体、终产品和环境中检出微生物的鉴定提供指导。当微生物的鉴定结果有争议时，以《伯杰氏系统细菌学手册》（《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》）现行版的鉴定结果为准。



目前《伯杰氏系统细菌学手册》中对细菌分类的描述是通过遗传物质的分析比较来实现的。通过未知微生物的DNA与已知微生物的DNA比较，能够确定亲缘关系的远近。基因型的鉴定可通过DNA杂交、限制性酶切片图谱的比较和/或DNA探针完成，若DNA-DNA的杂交亲缘关系大于70%时，表明微生物是同一种属；表2系统发育典型的分析方法是通过对细菌16S rRNA或真菌18S rRNA基因的部分碱基序列来实现，即经过聚合酶链反应(PCR)进行基因扩增、电泳分离扩增产物、以双脱氧链终止法进行碱基测序，然后与经验证过的专用数据库或利用公共的数据库(不一定经过验证)进行比对。

22

### 1. 在药品微生物鉴定领域的应用

2008年度全球排名前25位的制药集团中，有22家集团已经将ThermoFisher公司的MicroSEQ®自动微生物基因分析鉴定系统用于其日常微生物检测中。

美国FDA在对生产无菌制剂和生物药品的指导性纲要《工业指南用无菌工艺生产的无菌产品—现行GMP》中更是明确提出“快速遗传类型测定方法被建议用于鉴别目的，因为这种方法已经证明比生物化学方法和表型技术更精确和准确。”除美国之外，澳大利亚、日本及欧盟的药典中也已明确推荐使用基因分析的方法用于微生物的鉴定。

### 2. 微生物鉴定基本原理:

16S rRNA基因是伯杰氏手册(Bergey' Manual)细菌菌种分类的客观基础，也是DNA测序鉴定分型的基础。MicroSEQ®微生物鉴定系统是专门为微生物测序分型所设计，结合最新的DNA测序技术、强大的分析软件，通过对细菌共有的16S rRNA基因进行自动化测序得到细菌鉴定结果；而对于真菌鉴定则通过对真菌26S rRNA基因上的D2基因片段进行测序。

### 3. 检测平台：



Applied Biosystems™基因分析仪以可靠性和值得信赖的结果为立足点。作为 Applied Biosystems™毛细管电泳(CE)基因分析仪产品系列的最新成员，SeqStudio 基因分析仪同样基于这一理念，但同时又追求易用、易维护，易于存取和便于分享数据。其先进特性在于将 Sanger 测序和片段分析的可靠性，与远程监控 和云应用便利性结合在一起。

多功能卡夹在最大程度上提升了平台的高效和便利。SeqStudio 基因分析仪采用一种含有毛细管阵列、POP 胶以及阳极缓冲液的多功能卡夹。该卡夹可插拔，并可在仪器上存放达四个月之久。每个卡夹上均含有 SeqStudio 系统所独有的新型聚合物，无需重新配置即可进行 Sanger 测序和片段分析。配备 4 道毛细管可以处理来自 标准 96 孔板或 8 联管的样品。卡夹和阴极缓冲液容器均带有射频识别(RFID)标签，可跟踪二者各自在仪器上加样(卡夹)和存放的时长(阴极缓冲液)。这一特性使科研人员可以利用同一台仪器，根据需要管理并使用自己的卡夹，进一步提高灵活性。最后，SeqStudio 基因分析仪的维护工作也得到简化。仪器校准工作通过成像和算法工具的先进功能 自动化完成。

SeqStudio 仪器采用紧凑的外观设计，同时配有机载计算机和一体触摸屏，可以快速、直观、灵活的进行运行设置。运行软件经过专门配置，可在运行不中断的情况下，在同一块板上设置测序和片段分析反应并在仪器上运行。例如，在同一次 CE 运行中，可将基于测序的位点突变筛选检测与基于片段分析的 CNV 检测结合在一起。同时仪器具备无线

连接功能。可以通过联机触摸屏，远程计算机和移动设备 APP 操作仪器。只要能上网，就能随时随地地访问运行设置、反应板图、运行条件和分析设置。加样条件、重新加样和重新调整加样次序可在运行期间调整，从而最大限度提高从每块板采集优质数据的能力。采集数据后，基于网页浏览器的应用程序组合包(Sanger Quality Check、Sanger Variant Analysis 和 Next-Generation Confirmation (NGC) )可轻松、方便地分析数据。

#### 4. 产品性能:

- **强大的细菌和真菌鉴定功能:**

- 现有的配套数据库已建立**2100种细菌和1114种真菌**的的序列信息，其中已经包含非发酵性革兰阴性菌、杆状菌、棒状杆菌、分枝杆菌、葡萄球菌、放线菌等。所有录入的序列都经过验证以确保正确的鉴定结果。在现有数据库中，已经包括了制药生产环境和药品成品中已知的绝大部分细菌和真菌。
- 用户还可以将检测获得的数据与NCBI公共数据平台上的已知数据分析比对。
- 与此同时，用户也可以将自己独有的菌种序列加入MicroSEQ®数据库或者加入其他新的序列，从而建立自己个性化的菌株序列文库。
- 此外，因为该鉴定方法是基于核酸序列的分析，不同的微生物具有不同的核酸序列，所以随着越来越多微生物物种的核酸序列被破解，鉴定范围可以无限延伸。

- **鉴定成功率大大提高:**

传统的生化鉴定系统，鉴定成功的很重要前提之一是要确保微生物处于良好的生长状态，因为只有生长状况良好的微生物才能表现出典型的生化特征。因此，传统生化法往往需要很长的时间用于目的细菌的分离、修复，且生化法对难培养的细菌常常束手无策。但是，ThermoFisher 公司的微生物鉴定系统是基于 16s rRNA 核酸序列的分析，对于每种细菌而言，其高度保守的 16s rRNA 核酸序列不受生长条件和外在环境的制约，即使是难培养的细菌，也能保证获得良好的鉴定结果。统计数据显示，使用 ThermoFisher 公司的 MicroSEQ®微生物鉴定系统，鉴定失败率可以从传统生化鉴定方法的 **20% 以上**下降到 **2% 以下**。

- **快速获得结果:**

- 得到细菌/真菌的单菌落后，可在 **5 小时**内完成鉴定，这是传统的检测方法往往需要数日甚至更长时间才能完成的工作。

➤ 此外，因为对微生物生长状态没有要求，在细菌培养时间上也比传统生化方法大大缩短。

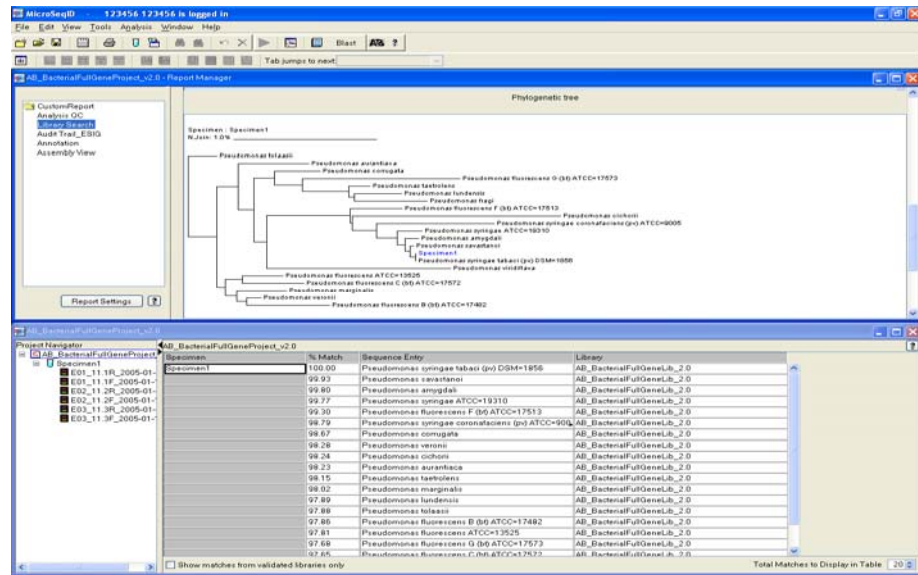
• **良好的操作性：**

- 不需要任何菌种分类的知识，不需要进行革兰染色和生化检测就能够得到准确、高重复性的实验结果。
- 操作简便，单菌落的挑取、DNA 提取、PCR 扩增、测序反应、软件分析几个简单的步骤即可获得微生物鉴定结果。

• **功能强大的应用软件：**

拥有微生物DNA测序和比对软件。MicroSEQ® ID软件自动将测序结果与MicroSEQ®微生物数据库中经过验证的序列进行比较，得到一个比较序列分析结果最接近的菌株清单。

检测结果根据样本的遗传距离排列，在显示屏上以种系发生树方式显示，非常方便了解物种间的亲缘关系。（参见下图）



**ThermoFisher 微生物基因分型鉴定系统与 Vitek 2的对比分析**

对比项目	MicroSEQ微生物基因分型鉴定系统	bioMerieux Vitek 2 微生物鉴定系统
技术平台	自动基因序列分析	约15种生化、代谢反应的汇总
鉴定范围	细菌：包括2100种各种类型的细菌 真菌：包括1114种真菌；霉菌、酵母菌均可鉴定 延展性：随着数据库的补充，鉴定范围还在不断扩展	细菌：约600种，无法鉴定放线菌 真菌：可以鉴定约50种酵母菌，无法鉴定霉菌
对样品的要求	对菌的生长状态没有要求，即使是难培养的	延展性：生化鉴定方法已经发展到平台期，鉴定范围基本没有继续扩充的空间 菌生长状态必须良好，菌长势不好或难培养

<p><b>结果成功率及准确度</b></p>	<p>菌也能获得结果</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 对制药行业常见的18个ATCC标准菌种鉴定的准确性达到100%（参考文献：Alexander, R, et al., <i>New Technologies Forum 6: Rapid Methods in Microbiology Report</i>. European Pharmaceutical Review, 2, 43-49, 2003.）</li> <li>2. 只要能得到微生物DNA，就能得到结果</li> <li>3. 即使极少数样品序列在现有数据库中无法找到匹配结果，会提示No ID，不会出现 Wrong ID</li> <li>4. 杂菌混合样会在显示屏上明显辨出</li> </ol>	<p>的菌会对检测结果造成影响</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 30%-70%（参考文献：Alexander, R, et al., <i>New Technologies Forum 6: Rapid Methods in Microbiology Report</i>. European Pharmaceutical Review, 2, 43-49, 2003.）</li> <li>2. 只能鉴定活的微生物</li> <li>3. 可能出现错误检测结果的情况，即可能将A菌判断为B菌</li> <li>4. 杂菌混合样会干扰检测结果，导致错误的结果</li> <li>5. 对于水产品的检测，VITEK效果较差，可能因为水产品成分比较复杂，对基于酶联免疫的方法有干扰。</li> <li>6. 无法准确鉴定空肠弯曲杆菌，在VITEK上只能鉴定出弯曲杆菌属，要鉴定空弯，必须要配合其他生化试验</li> </ol>
<p><b>系统开放程度</b></p>	<p>支持建立个性化的菌株序列文库 即使现有数据库中无法找到匹配结果，仍可以与NCBI平台上与新进研究进展比较序列信息，且可以在不同实验室间共享和分析</p>	<p>没有此功能</p>
<p><b>检测时间</b></p>	<p>培养时间：18-24小时 实验操作时间：5小时 总时间：小于23-29小时</p>	<p>总时间：53-120小时</p>
<p><b>对操作失误的响应</b></p>	<p>可在实验过程中校正是否存在操作误差</p>	<p>实验中途无法判断实验过程中是否存在操作错误</p>
<p><b>实验成本</b></p>	<p>检测成本由检测数量决定</p>	<p>综合考虑检测时间、有时无法得到准确检测结果等因素带来的损失，实际高成本</p>
<p><b>其他功能</b></p>	<p>还可用于微生物溯源分析。对药品污染事件的溯源分析很可能将成为药品监管的下一步工作内容 可以做植物和微生物基因组的AFLP分析以及其他测序，片段分析，SNP分析等</p>	<p>不具备溯源分析功能 没有AFLP，测序和SNP等更深入的微生物分析功能 可以做药敏试验，但药敏试验主要在医院，CDC等单位使用，药检部门无需此功能</p>

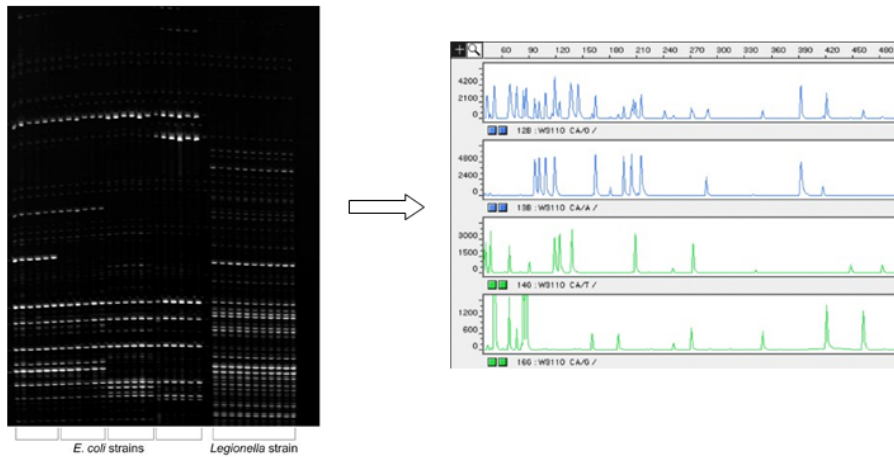
**5. 一套完整和高效的微生物鉴定解决方案：**

对于实验室来说，如何建立一套完整高效的微生物鉴定系统至关重要。这其中，既要考虑常规检测所涉及的简便性、实用性，也要考虑建立行之有效的能解决困难样本的能力。如何将这两方面的要求结合在一起，是最为重要的。

利用 MicroSEQ 全自动微生物鉴定系统，不仅能完成到种水平的鉴定，还能够完成菌种分型以进行进一步溯源分析。

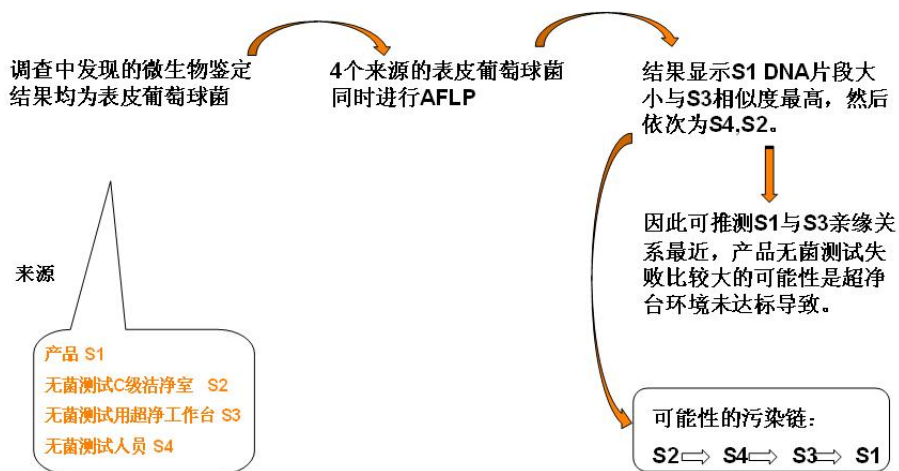
MLVA, AFLP 等分子分型方法可在微生物鉴定系统上完成，进行污染源的调查。例如利用 AFLP 的方法调查终产品中微生物的来源。

基于 AFLP 的微生物分型可以实现同一血清型下不同来源菌株的区分，利用毛细管电泳平台的高分辨率和稳定性，将选择性扩增的限制性酶切片段信息快速分析出来，并对不同样本使用不同的荧光标记，以得到菌株的特异性指纹信息。



AFLP 方法可用于对微生物的溯源分析，如污染来源等。

### AFLP溯源应用举例



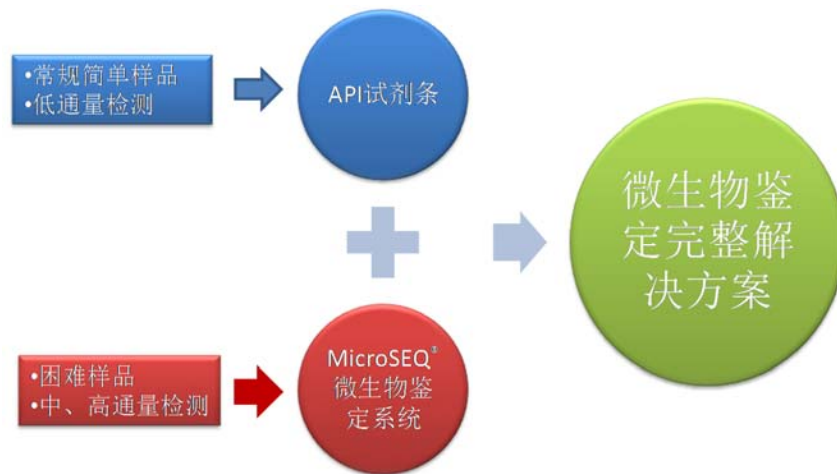
Micro SEQ®ID 鉴定系统并结合其他分子分型技术 AFLP 可以最大限度的满足对微生物鉴定的快速，准确，共享的要求。其标准化的试剂，标准的流程，软件对数据质量的分析

最大限度的保证了鉴定结果的一致性，具有可重复性高，操作易掌握，对样本要求低，精度高，准确度高，数据可共享，可自建数据库等特点，除了鉴定还同时具有分型溯源等功能。

Micro SEQ®ID 的应用将极大的提升实验室的鉴定能力，并对污染源的溯源及调查提供更好的支持。

此外，在建立大型的鉴定系统时，还必须用发展的眼光从长远的应用着手，建立一套至少在接下来3-5年能保证技术水平不落后的检测手段。这也对如何在众多鉴定系统中正确选型提出了很高的要求。

基于以上几个方面的考虑，我们推荐您采用以下的组合方式建立贵实验室的微生物鉴定体系：



## 应用实例

### 1: MicroSeq 系统应用于药厂生产区域微生物鉴定

《欧洲药理学综述》中发表的文章，就药厂生产区域常见的 18 种微生物进行鉴定，对多种快速微生物鉴定的方法进行比较，结论是 MicroSeq 系统是唯一能够进行 100%分型鉴定和 100%重现性的系统。



**New Technologies Forum 6: Rapid methods in microbiology Report**

R. ALEXANDER\*, A. A. CLEMENTS\*, R. GUEST\*, K. LEIFER\*, A. C. MOFFAT\*, F. GRAHAM\*, K. PUGH\* and S. WICKS\*

\*Medicines Control Agency, †Royal Pharmaceutical Society, ‡Oxoid/SmithKline, §Hesse Associates, ¶MDS, ††Hera

The sixth New Technologies Forum, on Rapid methods in microbiology (RMM), was held at the Royal Pharmaceutical Society on Thursday 6 February 2003. Twenty-five delegates attended from industry, academia, the Medicines Control Agency, and the Royal Pharmaceutical Society.

James Bruce (Acagenics) gave an overview of the methods for the identification of microorganisms, including classical methods, those based on cellular fatty acids, utilisation of carbon sources and genetic methods.

Those based on phenotype could be quite variable. For example, fatty acid composition was dependent on temperature, culture age and growth medium. Dr Bruce then described a classification system based on phylogenetic characters. This had the advantage that the sequence characteristics (based on genes coding for rRNA of the small ribosomal sub-unit) are robust and are not influenced by external factors. He then described a trial to determine the accuracy and reproducibility of species determination in 18 known American-type culture collection (ATCC) strains of organisms most frequently found in pharmaceutical manufacturing areas. The features of the genotypic (MicroSeq®, Riboprinter®) and phenotypic (Sherlock®, MicroLog®, Vitek®) identification systems were described. When used to test the strains of microorganisms, the genotypic tests performed better.

	Accuracy	Reproducibility
Microseq®	100%	100%
Riboprinter®	81%	97%
Sherlock®	50%	81%
MicroLog®	65%	62%
Vitek®	33%	89%

It was noted that the Vitek system used a clinical database. A similar outcome was obtained in tests on samples of unknown organisms and in the best case only 1% of the unknowns were unidentified for genus. The methods would further improve as more organisms were characterised.

The full report and more details about the New Technologies Forum are to be found on the Royal Pharmaceutical Society's Homepage at <http://www.rpsph.org.uk/pdf/ntf03.pdf> and <http://www.rpsph.org.uk>, respectively.

The full report is published in the European Pharmaceutical Review (Russell Publishing)

《欧洲药理学综述》发表文章：

“关于快速微生物鉴定方法的报告”

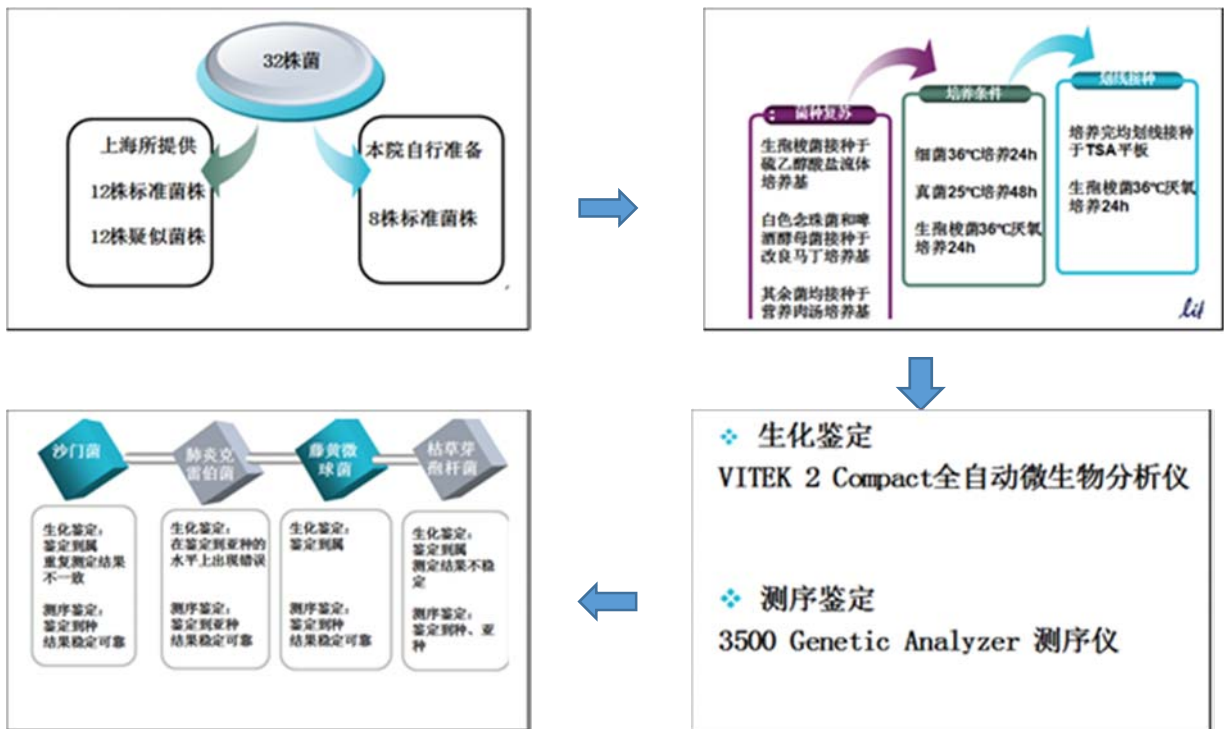
	Accuracy	Reproducibility
Microseq®	100%	100%
Riboprinter®	81%	97%
Sherlock®	50%	81%
MicroLog®	65%	62%
Vitek®	33%	89%

检测药厂生产区域内常见的18种微生物类型，  
— MicroSEQ 是唯一能够进行100%分型鉴定和100%重现性的系统



Alexander paper *life* technologies

应用实例 2：浙江药监所利用 MicroSeq 系统进行药品控制菌检查的研究



结论，采用生化鉴定和测序对 32 株菌进行鉴定，鉴定结果基本一致。生化鉴定部分菌株只能鉴定到属，而通过对 16S rDNA 和 LSU rDNA 测序部分菌可鉴定到种甚至亚种水平。生化鉴定操作过程相对复杂繁琐，影响因素较多。因此，测序鉴定的结果准确、可靠、分辨率高，能够鉴定到种、亚种，而且操作简单、标准的操作流程，结果重现性高。