

基于分枝菌酸的分枝杆菌反相高效液相色谱分型鉴定方法*

杜 蓉^{1,2}, 陈保文³, 郭 磊¹, 李 阳¹, 谢剑炜¹, 王国治³, 周宏兵²

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006;
3. 中国药品与生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 采用反相高效液相色谱法(HPLC)构建了49种分枝杆菌标准菌株的分枝菌酸指纹图谱库,并对分枝杆菌进行分型鉴定。菌株经培养(对于慢生长分枝杆菌培养3周,快生长分枝杆菌培养1周)后,取两植菌勺的量,皂化1h后,于4℃下储存。通过酸化方法提取分枝菌酸,并用4-溴苯甲酰基溴衍生化,以HPLC分析分枝杆菌衍生物,并以其峰形的分布及峰的相对保留时间、相对峰高为指标对分枝杆菌进行分型鉴定。该法重现性良好,各峰保留时间的相对标准偏差为0.13%~1.07%。根据构建的49种《伯杰细菌鉴定手册》中所载入的分枝杆菌标准菌株的分枝菌酸指纹图谱库,发现不同菌种的分枝菌酸的指纹图谱分别具有单簇峰、双簇峰、三簇峰(含多簇峰)的特征。依据相对保留时间和相对峰高的不同,对49种分枝杆菌中的41种进行了分型。结果表明,所建立的反相HPLC法可快速准确地对分枝杆菌进行分型鉴定。

关键词 反相高效液相色谱法;分枝菌酸;指纹图谱;分枝杆菌;分型;鉴定;结核分枝杆菌

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2008)05-0534-06 栏目类别:研究论文

Identification of *Mycobacterium* species using reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of mycolic acid

DU Rong^{1,2}, CHEN Baowen³, GUO Lei¹, LI Yang¹, XIE Jianwei¹,
WANG Guozhi³, ZHOU Hongbing²

(1. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China;

2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: A method for the identification of *Mycobacterium* species using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was developed. The fingerprints library was constructed on the basis of RP-HPLC chromatograms of the mycolic acids derivatives from 49 *Mycobacterium* species cultures. Two inoculation loops of *Mycobacterium*, for fast growth with one week incubation or for slow growth with three weeks incubation, were saponified for 1 h and stocked at 4 °C. The mycolic acids from each culture of *Mycobacterium* species were acidified, extracted, derivatized, and analyzed by the RP-HPLC method. On the basis of the HPLC patterns of relative retention time and relative peak height, the identifications of *Mycobacterium* species were performed. This established method has a good precision of retention times with the relative standard deviations (RSDs) ranging from 0.13% to 1.07%. The mycolic acids fingerprints library of HPLC patterns was set up, including 49 species that were recorded in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Three patterns were observed from the chromatographic behaviors of mycolic acids derivatives, including single peak-cluster, double peak-clusters, triple and multiple peak-clusters. Forty-one species were successfully identified according to the different relative retention times of the peaks and the relative peak heights. The established method can identify *Mycobacterium* species with rapidity and high reliability.

收稿日期 2008-03-28

第一作者:杜 蓉,硕士研究生,陈保文,副研究员。

通讯联系人:谢剑炜,研究员,博士生导师。Tel: (010) 66931649, E-mail: xiejw@bmi.ac.cn; 王国治,研究员。Tel: (010) 67095218, E-mail: tbtestlab@163.com.

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21202)。

* 本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722059>)。

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ; mycolic acid ; fingerprints ; *Mycobacterium* ; typing ; identification ; *Mycobacterium tuberculosis*

近年来,由于移民、艾滋病病毒(HIV)感染、耐药性等因素,使结核病疫情呈全球性回升。我国是全球 22 个结核病高负担国家之一,肺结核病人数量位于全球第二位。据调查,目前全国结核菌感染人数约为 5.5 亿,结核病患者达到 500 万之多^[1]。结核病临床特征表明其致病菌主要是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*, MTB),MTB 在微生物分类中属于放线菌目分枝杆菌科分枝杆菌属。《伯杰细菌鉴定手册》所确认的分枝杆菌有 54 种,除 MTB 外还有非结核分枝杆菌(NTM)^[2]。NTM 所引起的结核样病变与结核病的临床表现相似,因此与结核病很难区别,但两者的药物敏感性和化疗方案均有所不同。因此,分枝杆菌菌种的快速鉴定不仅在流行病学上,而且在临床诊断和治疗上均有十分重要的意义。

目前确认 MTB 和各种 NTM 常用的方法有镜检法、分离培养法、免疫学诊断和分子生物学诊断等方法。分离培养法虽然目前被称为“金标准”,但其所需培养时间长,免疫学检测的特异性不高,聚合酶链式反应(PCR)法对检测技术和仪器要求较高,检测费用和假阳性也较高^[3-6]。分枝杆菌细胞壁脂质中含有丰富的分枝菌酸(mycolic acid, MA),而分枝菌酸的各脂肪酸的碳链长度、不饱和状态、官能团及含量在各生物种型之间呈现指纹特征。通过反相高效液相色谱法(HPLC)分析比较分枝杆菌的 MA 指纹图谱的差异,可实现分枝杆菌种间水平的分型鉴定。美国疾病预防控制中心(CDC)研究了 HPLC 法鉴别分枝杆菌的可靠性并建立了 HPLC 法鉴别分枝杆菌种属的方法^[7-9]。目前国外报道鉴定的谱库菌种为 20~30 种,国内报道鉴定的谱库菌种为 18 种^[10,11],尚存在一定的局限。由于目前已有的谱库不能涵盖所有《伯杰细菌鉴定手册》中载入的分枝杆菌,因此对谱库外未知的菌种就不能作出准确的鉴定。为此,本文采用 HPLC 法构建了 49 种《伯杰细菌鉴定手册》中载入的分枝杆菌的分枝菌酸指纹谱库。

1 实验部分

1.1 49 种分枝杆菌标准菌株

非洲分枝杆菌(*M. africanum*),田野分枝杆菌(*M. agri*),爱知分枝杆菌(*M. aichiense*),亚洲分枝杆菌(*M. asiaticum*),金色分枝杆菌(*M. aurum*),南非分枝杆菌(*M. austroafricanum*),鸟分

枝杆菌(*M. avium*),牛分枝杆菌(*M. bovis*),龟分枝杆菌龟亚种(*M. chelonae* subsp. *Abscessus*),龟分枝杆菌脓肿亚种(*M. chelonae* subsp. *chelonae*),干田分枝杆菌(*M. chitae*),楚布分枝杆菌(*M. chubuense*),迪氏分枝杆菌(*M. diernhoferi*),杜氏分枝杆菌(*M. duvalii*),诡诈分枝杆菌(*M. fallax*),产鼻疽分枝杆菌(*M. farcinogenes*),微黄分枝杆菌(*M. flavescens*),偶然分枝杆菌(*M. fortuitum*),加地斯分枝杆菌(*M. gadium*),胃分枝杆菌(*M. gastri*),浅黄分枝杆菌(*M. gilvum*),戈登分枝杆菌(*M. gordonae*),胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*),堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*),科莫斯分枝杆菌(*M. komossense*),海分枝杆菌(*M. marinum*),田鼠分枝杆菌(*M. microti*),新金色分枝杆菌(*M. neoaurum*),不产色分枝杆菌(*M. nonchromogenicum*),奥布分枝杆菌(*M. obuense*),副偶然分枝杆菌(*M. parafortuitum*),草分枝杆菌(*M. phlei*),猪分枝杆菌(*M. porcinum*),灰尘分枝杆菌(*M. pulveris*),罗德岛分枝杆菌(*M. rhodesiae*),瘰疬分枝杆菌(*M. scrofulaceum*),塞内加尔分枝杆菌(*M. senegalense*),施氏分枝杆菌(*M. shimoidei*),猿猴分枝杆菌(*M. simiae*),耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*),苏加分枝杆菌(*M. szulgai*),土地分枝杆菌(*M. terrae*),抗热分枝杆菌(*M. thermoresistibile*),东海分枝杆菌(*M. tokaiense*),次要分枝杆菌(*M. triviale*),结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*),溃疡分枝杆菌(*M. ulcerans*),母牛分枝杆菌(*M. vaccae*),蟾蜍分枝杆菌(*M. xenopi*)。以上实验用分枝杆菌标准菌株及卡介苗(BCG)均由中国药品生物制品检定所分枝杆菌专业实验室培养并提供。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配有自动进样器、紫外检测器、色谱工作站(Agilent 公司,美国);隔膜泵-离心蒸发浓缩仪、冷阱-机械泵-离心蒸发浓缩仪(Labconco 公司,美国);BF-2000M 型氮气吹干仪(八方世纪公司,北京)。

甲醇、二氯甲烷和氯仿均为色谱纯(J. T. Baker 公司,美国);双环己基 18 冠-6 醚及 4-溴苯甲酰基溴为色谱纯(Fluka 公司,美国);高分子内标(HMIS)由美国 CDC 的 W. R. Butler 赠送。其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.3 样品制备

1.3.1 标准菌株的培养

将分枝杆菌接种在改良的罗氏培养基上,于适宜的温度下培养。

1.3.2 皂化

取 1~2 接种环分枝杆菌培养物于具聚四氟乙烯盖子的硼硅玻璃管(13 mm × 100 mm)中,加入 2 mL 4.5 mol/L KOH 溶液(以甲醇-水(体积比为 1:1)为溶剂),充分振摇混合后于 121 °C 下灭菌 1 h,并使之成为脂肪酸钾盐。以上工作均在中国药品生物制品检定所分枝杆菌专业实验室中完成。

1.3.3 分枝菌酸的提取

将上述皂化液冷却至室温后加入 2 mL 氯仿,再缓慢加入 1.5 mL 5 mol/L 盐酸溶液,剧烈振荡、静置、分层。重复操作此步骤直至两层澄清,提取有机层至离心管,并离心蒸发溶剂至干,得到游离的 MA。

1.3.4 分枝菌酸的衍生

向分枝菌酸提取液中加入 0.1 mL 0.2 mol/L KHCO₃ 溶液(以甲醇-水(体积比为 1:1)为溶剂),浓缩至干,然后加入含 50 μL 衍生化试剂(将 0.1 mol/L 的 4-溴苯甲酰基溴和 0.005 mol/L 的双环己基-18-冠-6-醚溶于乙腈中)的 1.5 mL 氯仿溶剂,在 90 °C 下加热 45 min,衍生化产物为溴代苯甲酰脂肪酸酯类化合物。样品冷却至室温后,加入 1 mL 2.5 mol/L 盐酸溶液(以甲醇-水(体积比为 1:1)为溶剂)进行萃取,剧烈振荡、静置、分层,移出氯仿层至另一离心管中,浓缩至干,样品置于 4 °C 冰箱中避光保存备用。

进行 HPLC 分析前用 CH₂Cl₂ 溶解样品,并加入适量的高分子内标。

1.4 HPLC 条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:35 °C;流动相:A 相,95% CH₃OH-5% CH₂Cl₂;B 相,5% CH₃OH-95% CH₂Cl₂;梯度洗脱程序:0 → 1 min,由 98% A 线性递减至 80% A;1 → 25 min,80% A 线性递减至 35% A;25 → 25.5 min,35% A 线性递增至 98% A;维持 98% A 至 30 min;流速:1.5 mL/min;紫外检测波长 260 nm;进样量 20 μL。

1.5 影响分枝杆菌分型鉴定因素的考察

以 *M. vaccae* 为受试菌,选取其 MA 指纹图谱中的 11 个特征峰考察培养菌量、培养时间、贮存时间、皂化时间等对 MA 相对保留时间和相对峰高的影响。考察上述因素对 MA 相对保留时间的影响时以保留时间最长的 11 号峰为参比峰,以其他峰与其

相比的相对保留时间为纵坐标做柱状图;考察上述因素对 MA 相对峰高的影响时则以信号最高的 9 号峰为参比峰,以其他峰与其相比的相对峰高为纵坐标做柱状图。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分离条件的优化

以 *M. smegmatis* 为受试菌优化高效液相色谱分离 MA 的梯度洗脱条件,以满足分枝菌酸指纹图谱分析及分枝杆菌鉴别的要求。分枝菌酸是一类高分子质量的含有 α-支链、β-羟基的脂肪酸类化合物,约占细胞壁干重的 60%,其基本化学分子式为 R₂CH(OH)CHR₁COOH,其中 R₁ 代表 C₂₀~C₂₄ 直链烯烃;R₂ 代表一种更为复杂的化学结构,在含 30~60 个碳原子的碳链中含有不同数目的双键、环丙烷环、甲基或氧官能团,如 -C=O, -CH₂OCH=, -COOH 等。MA 的碳原子个数、含量及比例因菌种的科和属不同而存在差异,分枝杆菌的 MA 的碳原子数为 C₆₀~C₉₀^[12]。MA 经衍生化生成弱极性的溴代苯甲酰脂肪酸酯类化合物,其在 CH₂Cl₂ 中的溶解性较好,一般选择 CH₂Cl₂ 和 CH₃OH 作为流动相^[12],并在反相色谱条件下进行洗脱。预先以一定的比例将两者混合,可克服因两者的相溶性较差导致的梯度洗脱时易产生气泡及造成基线漂移等问题,在 CH₂Cl₂ 中加入 5% CH₃OH 及在 CH₃OH 中加入 5% CH₂Cl₂ 时对分离基线影响较低。

进行 HPLC 分析时,溶剂和 MA 衍生化后的短链溴代苯甲酰脂肪酸酯类化合物等首先被洗脱,表现为一簇强紫外吸收的色谱峰(如图 1 中 0~5 min 内的色谱图所示);具有指纹特性的长链溴代苯甲酰脂肪酸酯类化合物则随着流动相中 CH₂Cl₂ 组分的比例增大而被洗脱。梯度洗脱的目的不仅是为了缩短长链溴代苯甲酰脂肪酸酯类化合物的保留时间,而且还要获得较好的峰形和分离度。我们以 *M. smegmatis* 为受试菌优化了流动相比例和梯度洗脱条件,最终得到“1.4”节的梯度洗脱程序,在此条件下基线较平稳,峰形对称,各组分间得到了较好的分离且保留时间适中,可进行分枝杆菌的分型鉴定。在此条件下,图谱呈现更复杂的三簇峰特征的分枝菌酸的各谱峰间亦可呈现良好的分离。典型的色谱图如图 1 所示。

2.2 方法学考察

2.2.1 影响因素

以 MA 指纹图谱呈三簇峰的 *M. vaccae* 为受试菌,分别考察了培养菌量、培养时间、4 °C 条件下的贮存时间、样品皂化时间等条件对分型鉴定的影响。

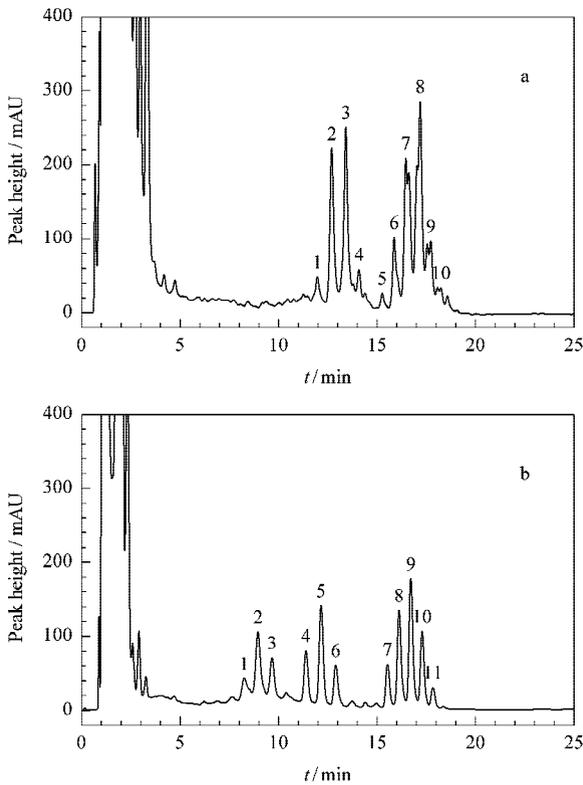


图 1 分枝杆菌分枝菌酸的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mycolic acids of *Mycobacterium* species
a. *M. smegmatis*; b. *M. vaccae*.

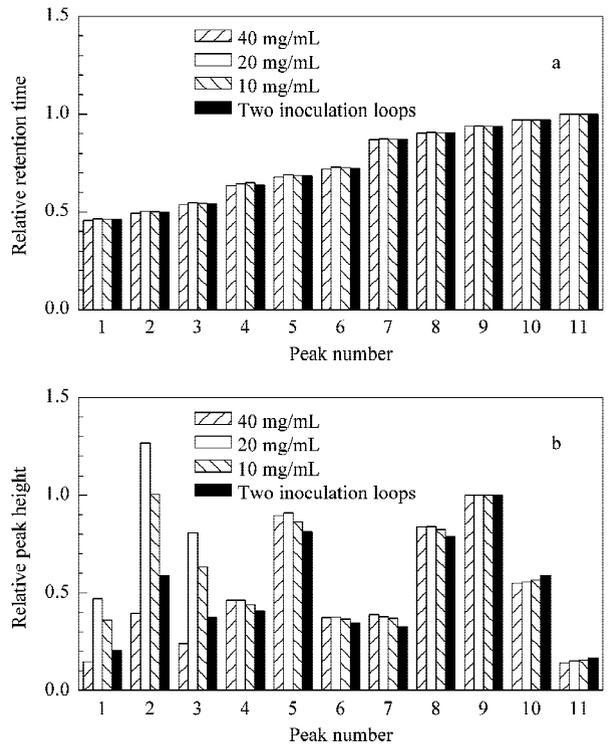


图 2 培养菌量对 *M. vaccae* 分枝菌酸的 (a) 相对保留时间和 (b) 相对峰高的影响

Fig. 2 Effects of the cultural quantity on (a) relative retention time and (b) relative peak height of mycolic acids of *M. vaccae*

选取 40、20、10 mg/mL 和 2 植菌勺菌量等不同水平的培养菌量考察培养菌量的影响。从图 2-a 中可见 MA 的相对保留时间稳定,表明培养菌量对 MA 的保留时间没有影响;从图 2-b 可见,除了保留时间较短的少数峰以外,MA 的主要峰的相对峰高呈现了相当好的稳定性,表明培养菌量对相对峰高影响不大。因此本文选择培养菌量为 2 植菌勺。分枝杆菌分为快生长分枝杆菌和慢生长分枝杆菌两类,以快生长的 *M. vaccae* 为例,选择 1 周、2 周、3 周的培养时间进行考察,结果表明,培养 1 周后 MA 各峰的保留时间即稳定,除保留时间较短的少数 MA 峰外,主要峰的相对峰高呈现相当好的稳定性,因此最终选择 1 周作为快生长分枝杆菌的培养时间;对于慢生长分枝杆菌,培养 3 周后可进行 HPLC 分析。样品在 4℃ 贮存条件下,一个月内稳定;皂化时间为 1~2 h 时对 *M. vaccae* 的 MA 指纹图谱无影响,故最终选择皂化时间为 1 h。

2.2.2 重现性

以高分子化合物为内标,可有效消除 HPLC 分析时的系统误差。7 次分析同一株 *M. intracellulare* 的 MA,内标校正后的叠加色谱图如图 3 所示,由此可见本法的重现性较好,各色谱峰的保留时间的相对标准偏差(RSD)介于 0.13%~1.07%。

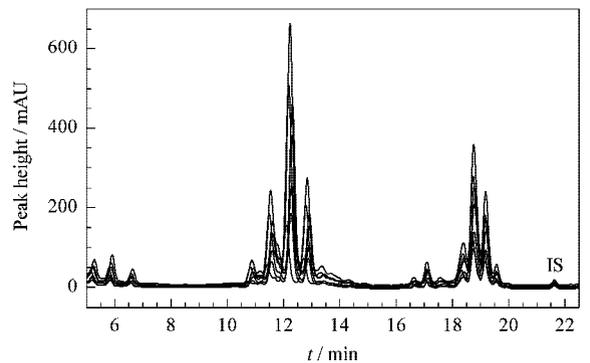


图 3 *M. intracellulare* 分枝菌酸的 HPLC 分离重现性考察 (n=7)

Fig. 3 Reproducibility of HPLC separation of mycolic acids of *M. intracellulare* (n=7)

2.3 分枝杆菌标准菌株的 MA 指纹谱库的建立及分枝杆菌的分型鉴定

通过对 49 种《伯杰细菌鉴定手册》中所载入的分枝杆菌标准菌株的 MA 的 HPLC 分析,建立了分枝杆菌标准菌株的 MA 指纹谱库。通过分析 MA 指纹图谱,发现分枝杆菌标准菌株的 MA 指纹图谱的峰形分布分为单簇峰(共 14 种)、双簇峰(共 23 种)、三簇峰(含多簇峰)(共 12 种)3 类。依据 MA 的保留时间和相对峰高的不同,同类峰形的分枝杆菌可以达到种间水平的分型鉴定。

2.3.1 MA 指纹图谱呈单簇峰特征的分枝杆菌的分型鉴定

对MA 指纹图谱为单簇峰的分枝杆菌,首先可根据 MA 特征峰的数目及相对保留时间的不同对其进行分型鉴定,如 *M. triviale*、*M. marinum*、*M. fallax* (见图 4-a)。BCG 和 *M. bovis* 之间采用生化方法难以鉴别^[13],但采用本法根据最高特征峰保留时间的差异,可进行明显的分型鉴定(见图 4-b);对于

MA 保留时间较相近的分枝杆菌,如 *M. kansasii* 和 *M. gordonae*(见图 4-c),还可比较两者 MA 的相对峰高,通过 *M. kansasii* 具有两个主峰,而 *M. gordonae* 只有一个主峰进行分型鉴定,但对于个别分枝杆菌,采用本法难以鉴别,如 *M. bovis* 和 *M. tuberculosis*,两者 MA 的保留时间和相对峰高均相似(见图 4-d),原因可能与两者为同一来源的不同变种有关。*M. gastri* 与上述两者采用本法亦难以鉴别(图略)。

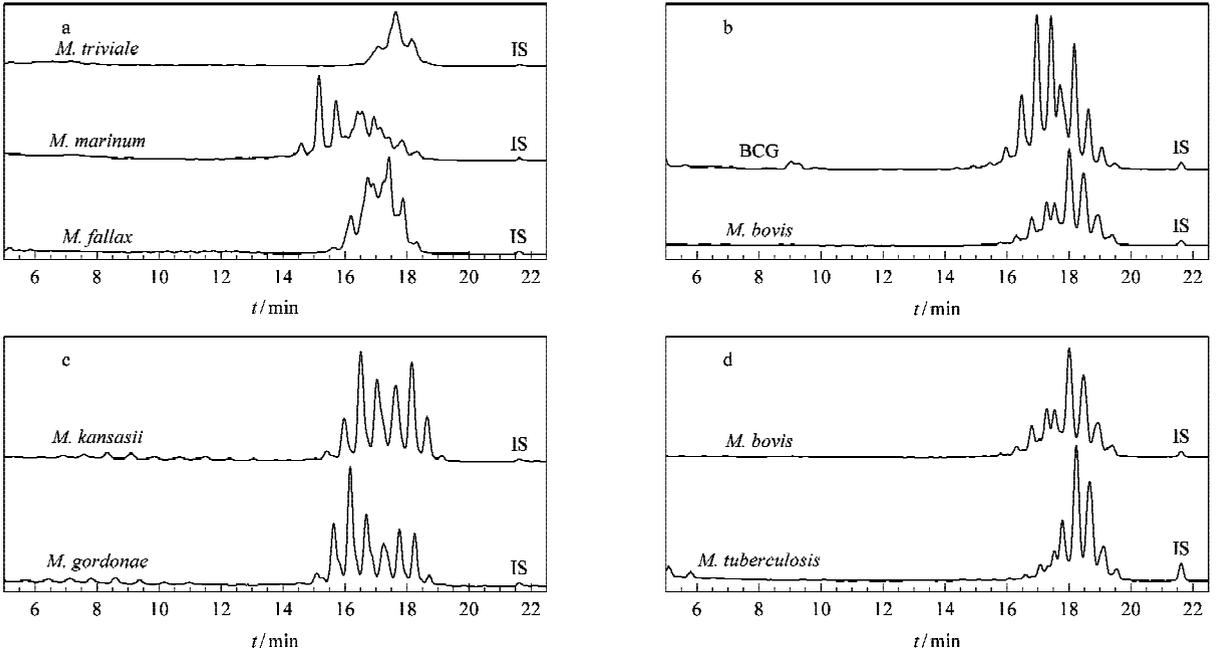


图 4 具有单簇峰特征的分枝杆菌分枝菌酸的 HPLC 谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of *Mycobacterium* mycolic acids with single peak-cluster

a. *M. triviale*, *M. marinum* and *M. fallax*; b. BCG and *M. bovis*; c. *M. kansasii* and *M. gordonae*; d. *M. bovis* and *M. tuberculosis*. IS: internal standard.

2.3.2 MA 指纹图谱呈双簇峰特征的分枝杆菌的分型鉴定

与 MA 指纹图谱呈单簇峰的分枝杆菌的分型鉴定相似,首先可根据其 HPLC 指纹图谱中 MA 的保留时间对分枝杆菌进行分型鉴定(见图 5-a)。对于通过 MA 的保留时间不易鉴别的分枝杆菌,如 *M.*

intracellulare 和 *M. avium*(见图 5-b),可根据 MA 指纹图谱中的峰 8 和峰 9 的相对峰高的微小差异进行分型鉴定,但要进行准确的鉴别,还需要辅以其他手段。另外,也存在通过 MA 的保留时间和相对峰高均难以鉴别的分枝杆菌,如 *M. aichiense*, *M. obuense* 和 *M. rhodesiae*(图略)。

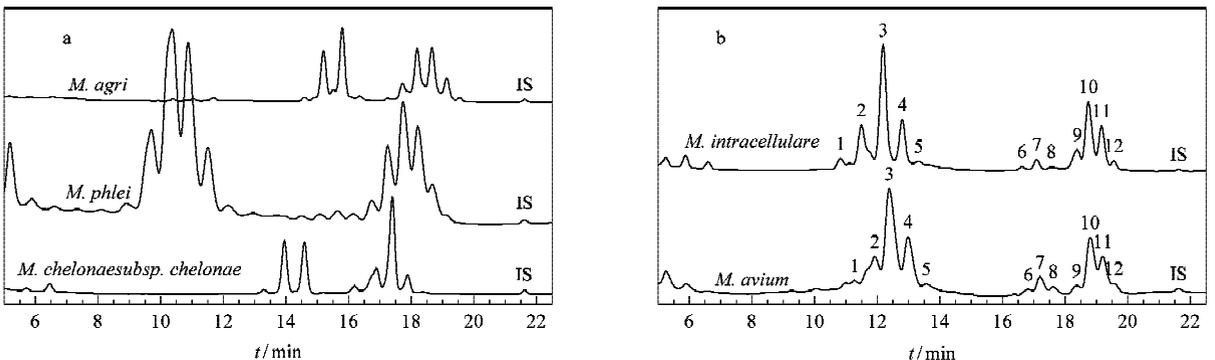


图 5 具有双簇峰特征的分枝杆菌分枝菌酸的 HPLC 谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of *Mycobacterium* mycolic acids with double peak-clusters

a. *M. agri*, *M. phlei* and *M. chelonae* subsp. *chelonae*; b. *M. intracellulare* and *M. avium*.

2.3.3 MA 指纹图谱呈三簇峰(含多簇峰)特征的分枝杆菌的分型鉴定

根据呈三簇峰(含多簇峰)的分枝菌酸指纹图谱可成功地对部分分枝杆菌进行分型鉴定,如 *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. aurum*(见图 6-a)。对

于 MA 的保留时间相似的分枝杆菌,如 *M. chubuense* 和 *M. gilvum*, 可以通过 MA 的峰数及相对峰高进行分型鉴定(见图 6-b)。另外,也存在通过 MA 的保留时间和相对峰高均难以鉴别的分枝杆菌,如 *M. austroafricanum* 和 *M. vaccae*(图略)。

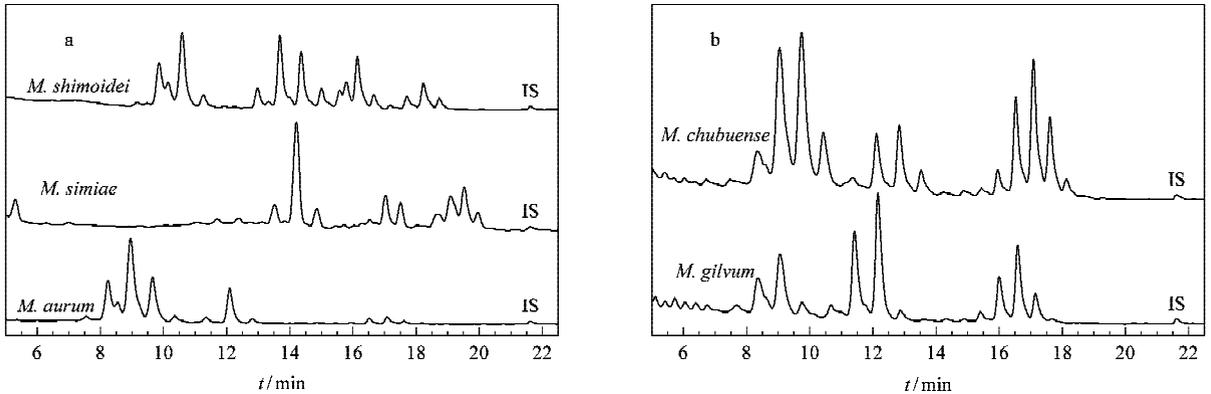


图 6 具有三簇峰特征的分枝杆菌分枝菌酸的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of *Mycobacterium* mycolic acids with triple peak-clusters

a. *M. shimoidei*, *M. simiae* and *M. aurum*; b. *M. chubuense* and *M. gilvum*.

3 结论

本研究以分枝杆菌标准菌株为受试菌,对分枝杆菌的培养、皂化、酸化提取、衍生化及高效液相色谱分析条件进行了考察和优化,建立了采用 RP-HPLC 对分枝杆菌进行快速准确分型鉴定的方法。构建了 49 种《伯杰细菌鉴定手册》中所载入的分枝杆菌标准菌株的 MA 指纹谱库,并据此对其中的 41 种分枝杆菌成功分型,为分枝杆菌的分型鉴定提供了重要的技术方法和谱图数据库。

参考文献:

[1] National Technic Steering Group of the Epidemiological Sampling Survey for Tuberculosis. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases (全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 中华结核和呼吸杂志), 2002, 25(1): 3

[2] Koh W J, Kwon O J, Lee K S. J Korean Med Sci, 2005, 20: 913

[3] Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos M C, et al.

Lancet, 2006, 368: 1 012

[4] Doherty T M, Demissie A, Olobo J, et al. J Clin Microbiol, 2002, 40: 704

[5] Parashar D, Chauhan D S, Sharma V D, et al. Indian J Med Res, 2006, 124: 385

[6] Li Y Q, Wang G Q, Mi J P, et al. Chinese Journal of Chromatography (黎源倩, 王国庆, 米建萍, 等. 色谱), 2005, 23(1): 103

[7] Butler W R, Kilburn J O. J Clin Microbiol, 1990, 28: 2 094

[8] US Department of Health and Human Services. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. 1996

[9] Butler W R, Guthertz L S. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 704

[10] Zhao F Y, Wang J C, Wang X X, et al. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases (赵凤仪, 王巨存, 王撷秀, 等. 中华结核和呼吸杂志), 2006, 29(7): 470

[11] Zhao F Y, Wang J C, Wang X X, et al. Chinese Journal of Laboratory Medicine (赵凤仪, 王巨存, 王撷秀, 等. 中华检验医学杂志), 2006, 29(3): 264

[12] Butler W R, Ahearn D G, Kilburn J O. J Clin Microbiol, 1986, 23: 182

[13] Floyd M M, Silcox V A, Jones W D, et al. J Clin Microbiol, 1992, 30: 1 327