

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.07

2 株圣乔治教堂诺卡菌的鉴定与药物敏感性分析*

顾全^{1a}, 柳朔怡², 韩素桂^{1b}, 张尊^{1a}, 孙尚凡³, 张玉敏^{1c} (1.唐山市人民医院 a.检验科, b.核医学检验科, c.输血科, 河北唐山 063000; 2.唐山市妇幼保健院产前诊断遗传病诊断中心, 河北唐山 063000; 3.唐山市中医医院检验科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 对 2 株圣乔治教堂诺卡菌临床分离株进行分类鉴定并测定其体外抗菌药物敏感性。方法 通过菌落形态、染色特性、16S rRNA 和 *hsp65* 基因比对, 对 2 株临床标本分离诺卡菌进行菌种鉴定。用 E-test 法测定 10 种临床常用诺卡菌抗菌药物最低抑菌浓度(MIC)值。采用微量肉汤稀释法和平板扩散法对复方磺胺甲噁唑药敏结果进行复核。结果 经表型和基因鉴定, 2 株临床分离株均鉴定为圣乔治教堂诺卡菌; E-test 法测定结果显示, 对阿米卡星、头孢曲松、亚胺培南、利奈唑胺、米诺环素、妥布霉素、头孢吡肟敏感, 对环丙沙星耐药。经微量肉汤稀释法和平板扩散法复核, 2 株诺卡菌对复方磺胺甲噁唑敏感。结论 通过表型特征联合 16S rRNA 和 *hsp65* 基因可鉴定圣乔治教堂诺卡菌至种。由于复方配比不同, 复方磺胺甲噁唑的体外药敏试验结果对治疗效果预测存疑。

关键词: 圣乔治教堂诺卡菌; 药敏试验; 复方磺胺甲噁唑

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

诺卡菌属是一类严格需氧菌, 革兰染色呈阳性或不定, 有弱抗酸性。其分类隶属于放线菌纲、放线菌目、棒杆菌亚目、诺卡菌科, 目前已知该属有效命名菌种有 111 个, 常见致病菌种有脓肿诺卡菌(*N. abscessus*)、皮疽诺卡菌(*N. farcinica*)、巴西诺卡菌(*N. brasiliensis*)等。圣乔治教堂诺卡菌(*N. Cyriacigeorgica*)是 2001 年命名的诺卡菌种, 但非新发致病菌^[1]。在确定独立分类位置之前多被鉴定为“星形诺卡菌(*N. asteroides*)”药物 VI 型。2005 年 Conville 等通过 16S rRNA 基因、*hsp65* 基因和 DNA-DNA 杂交等分类证据证实星形诺卡菌药物 VI 型应鉴定为圣乔治教堂诺卡菌^[2]。目前圣乔治教堂诺卡菌是日本、泰国和我国台湾地区诺卡菌病的主要致病菌种^[3], 并在近年来我国大陆地区报告比率逐渐上升, 部分地区可达 46%^[4]。按《临床微生物手册》(第 11 版)报道, 圣乔治教堂诺卡菌可能是常见的人类诺卡菌病原体, 之前报道的星形诺卡菌大部分是该种^[5]。随着分子鉴定技术的发展, 过去鉴定为“星形诺卡菌”或“星形诺卡菌复合群”菌株多被证实为其他已命名菌种, 严格意义的星形诺卡菌已少有致病报道^[5]。本研究对 2 株诺卡菌临床分离株进行表型与基因鉴定, 并对临床常用抗菌药物进行体外药敏试验, 为临床治疗提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源与初步鉴定 收集 2019 年唐山市人民医院临床分离诺卡菌菌株 2 株。其中 A30 分离自呼吸科患者支气管灌洗液标本, A151 分离自妇科患者痰标本。经革兰染色和弱抗酸染色镜下观察形态, 初步鉴定至诺卡菌属。

1.2 主要仪器及试剂 SLAN 基因扩增仪(上海宏石公司), ABI 3730 型 DNA 测序仪(美国 ABI 公司); 2×Taq PCR Mix 扩增体系(上海生工公司), 血琼脂培养基、巧克力平板、麦康凯平板(郑州安图公司), 药敏纸片与 E-test 药敏试条(温州康泰公司), 快速革兰染色液、快速抗酸染色液(珠海贝索公司), 引物合成与扩增产物测序由上海生工公司完成。

1.3 形态学鉴定 菌株分别接种血琼脂培养基、麦康凯培养基, 置 35 ℃ 培养 48~72 h, 观察菌落形态。革兰染色按试剂说明书进行操作; 弱抗酸染色参考快速抗酸染色试剂说明书略作改动: 石炭酸复红溶液染色 15 min, 0.2 mol/L 硫酸溶液脱色 3 min, 亚甲基蓝溶液染色 1 min。

1.4 基因扩增、测序与鉴定 用水煮裂解法提取 DNA^[6]。参照文献[7-8]合成原核生物 16S rRNA 基因通用引物 8F、1492R 和 *hsp65* 基因引物, 并参照文献反应条件进行。引物与扩增信息见表 1。用 2×Taq PCR Mix 预混液配制体系。扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 交由上海生工公司进行产物纯化并在 ABI 3730 型 DNA 测序仪上行 Sanger 双向

* 基金项目: 河北省医学科学研究重点课题(20171281)。

作者简介: 顾全, 1987 年生, 男, 主管技师, 硕士, 主要从事临床微生物学检验工作。

通信作者: 张玉敏, 主任技师, 硕士, E-mail: 812862379@qq.com。

测序。测序结果截去引物结合区并选取 QV 值>25 的片段,以 Blast 比对搜索 GenBank 数据库。以 MEGA 5.0 软件构建 16S rRNA 基因与 *hsp65* 基因系

统进化树,用邻接法与 Kimura 两参数模型,进化树拓扑枝以 Bootstrap 法自举检验 1 000 次。龟分枝杆菌作为系统进化树外枝。

表 1 基因扩增所用引物信息

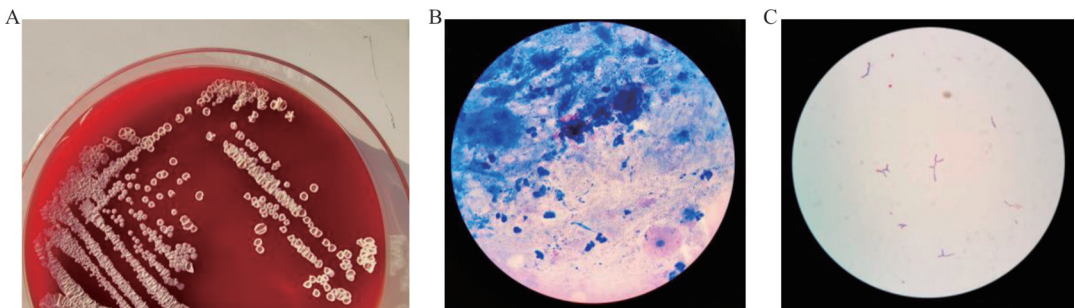
基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	片段大小(bp)	参考文献
16S rRNA	8F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	65	1 500	[7]
	1492R:AAGAGGTGATCCAGCCGCA			
<i>hsp65</i>	TB11:ACCAACGATGGTGTGTCCAT	55	441	[8]
	TB12:CTTGTCGAACCGCATACCCT			

1.5 药敏分析 用 E-test 方法测定最低抑菌浓度(MIC)^[9],测试药物包括阿米卡星、头孢曲松、环丙沙星、亚胺培南、利奈唑胺、米诺环素、妥布霉素、头孢吡肟、庆大霉素。35 °C 培养 48 h 后读取 MIC 值,若生长不足,培养时间延至 72 h。参照美国临床和实验室标准协会(CLSI) M24-A2 标准判读结果^[10]。用 E-test 法、微量肉汤稀释法和纸片扩散法对甲氧嘧啶/磺胺甲噁唑药敏结果进行验证,35 °C 培养 48 h,若生长不足延至 72 h。复方磺胺甲噁唑 MIC 值 ≤ 2 μg/mL/38 μg/mL 为敏感, ≥ 4 μg/mL/76 μg/mL 为耐药。纸片扩散法中,抑菌圈直径 ≥

35 mm 判为敏感, ≤ 15 mm 判为耐药。微量肉汤稀释法中,菌体生长量 80% 被抑制判为终点孔。

2 结果

2.1 菌株形态学鉴定 圣乔治教堂诺卡菌可在血平板、巧克力平板上缓慢生长,培养 24 h 后出现小的颗粒样菌落,培养 72 h 后呈淡黄色、干燥、堆积样菌落,有泥土气味,麦康凯平板未见生长。革兰染色阳性,菌体可部分脱色呈串珠状。有弱抗酸性,可抵抗 0.2 mol/L 硫酸溶液脱色,临床标本中菌体呈分枝状,可相互缠绕,见图 1。



注:A,圣乔治教堂诺卡菌血平板培养 72 h 生长菌落;B,痰标本中圣乔治教堂诺卡菌弱抗酸性染色形态(×1 000);C,圣乔治教堂诺卡菌血琼脂平板培养 72 h 革兰染色形态(×1 000)。

图 1 圣乔治教堂诺卡菌菌落形态与染色形态

2.2 基因鉴定与进化分析 A30 和 A151 16S rRNA 基因与圣乔治教堂诺卡菌(*N. cyriacigeorgica*, 登录号:NR041857.1)相似度分别为 99.92% 和 100%,与少食诺卡菌(*N. paucivorans*, 登录号:NR041863.1)相似度为 98.83% 和 98.59%,与星形诺卡菌(*N. asteroides*, 登录号:NR041856.1)相似度为 98.46% 和 95.53%。2 株临床分离株可鉴定为圣乔治教堂诺卡菌,测序生物信息学数据见表 2。经 2 次双向测序,发现 A30 菌种在 16S rRNA 基因 48 位为简并碱基 R(A/G),可能是该菌存在多拷贝的 16S rRNA 基因,见图 2。A30 和 A151 *hsp65* 基因与圣乔治教堂诺卡菌(*N. cyriacigeorgica*, 登录号:AY756522.1)相似度均为 100%,与其他诺卡菌种相似度低于 98.6%。

16S rRNA 基因与 *hsp65* 基因的系统进化树显示,A30 与 A151 均与圣乔治教堂诺卡菌 DDSM 44484 在同一拓扑分枝,与其他诺卡菌种有较大进化距离。见图 3、图 4。

表 2 2 株诺卡菌测序生物信息学分析数据

菌株	基因	连续读长(CRL)	平均质量分数(Trace Score)
A30	16S rRNA	949	49
		1 009	51
A30	<i>hsp65</i>	421	57
		420	55
A151	16S rRNA	995	50
		977	52
A151	<i>hsp65</i>	421	55
		421	56

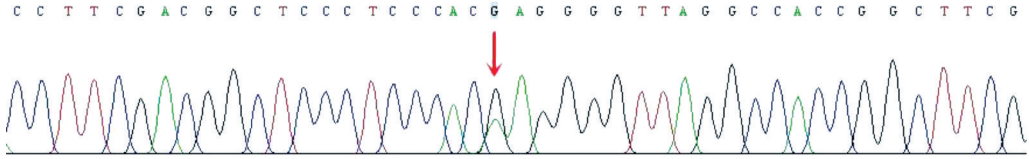
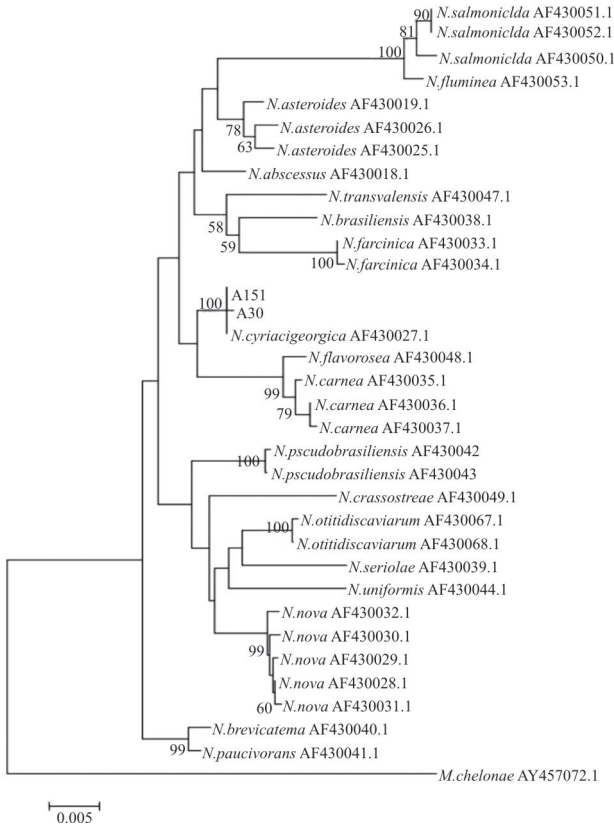
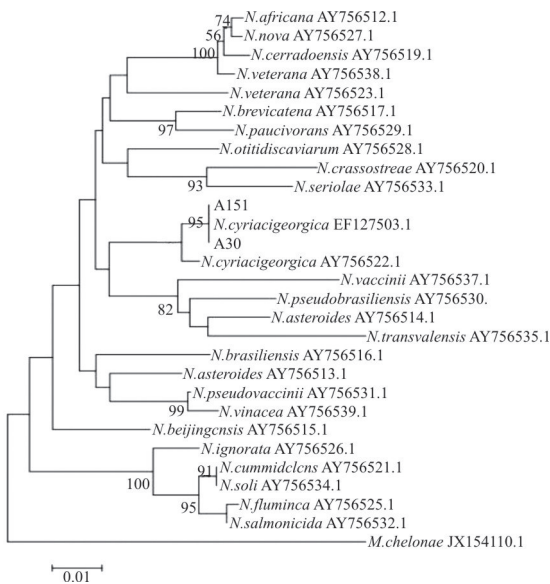


图 2 圣乔治教堂诺卡菌 A30 菌株 16S rRNA 基因多拷贝位点



注:以龟分枝杆菌 (*M. chelonae*) AY457072.1 为根。

图 3 圣乔治教堂诺卡菌 16S rRNA 基因系统进化树



注:以龟分枝杆菌 (*M. chelonae*) JX154110.1 为根。

图 4 圣乔治教堂诺卡菌 *hsp65* 基因系统进化树

2.3 药敏试验结果 2 株圣乔治教堂诺卡菌对阿米卡星、头孢曲松、亚胺培南、利奈唑胺、米诺环素、妥布霉素、头孢吡肟、复方磺胺甲噁唑均敏感,对环丙沙星耐药。纸片扩散法显示,A30 和 A151 菌株复方磺胺甲噁唑抑菌圈直径分为 38 mm 和 19 mm。E-test法和微量肉汤稀释法确定复方磺胺甲噁唑 MIC 值分别为 0.125 μg/mL/2.375 μg/mL 和 0.5 μg/mL/9.5 μg/mL。见表 3。

表 3 2 株圣乔治教堂诺卡菌抗菌药物敏感性结果

药物名称	MIC(μg/mL)	
	A30	A151
阿米卡星	0.5	2
头孢曲松	0.5	2
环丙沙星	>32	>32
亚胺培南	0.5	1
利奈唑胺	1	1
米诺环素	1	1
妥布霉素	0.064	0.125
头孢吡肟	2	4
复方磺胺甲噁唑 ^a	0.125/2.375	0.5/9.5
复方磺胺甲噁唑 ^b	0.125/2.375	0.5/9.5

注:a,E-test 法;b,微量肉汤稀释法。

3 讨论

圣乔治教堂诺卡菌的中文翻译尚有分歧,部分学者引用“盖尔森基兴诺卡菌”翻译。2019 年国际系统与进化微生物学期刊《International Journal of Systematics of Evolutionary Microbiology》更新了《国际原核生物分类命名法》,原核生物命名有明确的词源,中文翻译可参考词源。“*cyriacigeorgica*”由 2 个词根组成:“*cyriacum*”新拉丁语中性名词,来源于希腊语中性名词“*kuriakon*”,意为教堂;“*georgica*”新拉丁语阴性名词,意为“圣乔治”,“*cyriacigeorgica*”词源意为圣乔治教堂^[11]。诺卡菌镜下形态呈分枝状,弱抗酸性,属内鉴定较复杂,需结合碳源利用试验、硝酸盐还原试验、明胶液化、脲酶、药物敏感性等综合进行^[12]。16S rRNA 基因和 *hsp65* 基因是目前较为常用的诺卡菌种基因鉴定靶位。诺卡菌的 16S rRNA 相似度较高,部分诺卡菌菌种 16S rRNA 基因存在多拷贝^[13],若需准确鉴定至种,相似度需大于 99.8%。如本研究的 A30 菌株 16S rRNA 基因

测序结果显示在 48 位出现简并碱基 R(A/G), 多拷贝基因会影响比对结果准确性。圣乔治教堂诺卡菌为新命名菌种, 在 GenBank 数据库中的早期序列中, 有将圣乔治教堂诺卡菌错误标记为星形诺卡菌, 会影响鉴定结果。采用其他管家基因或构建系统进化树, 可增加鉴定的可信度。如 *hsp65* 基因, 相似度大于 99.5%, 可提供准确的鉴定依据^[8]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)为诺卡菌快速鉴定提供了新的方法。通过提取蛋白质法或菌液直接涂布法, 均能准确鉴定圣乔治教堂诺卡菌。但大部分诺卡菌种培养物不易乳化或存在噬琼脂现象, 这会增加菌悬液制备难度而影响鉴定准确率, 若选取早期培养菌落(菌龄小于 48 h), 可提升质谱鉴定率^[5]。

诺卡菌感染的首选用药为复方磺胺甲噁唑, 必要时可配伍亚胺培南。近年来不断出现诺卡菌耐药现象, 特别是磺胺类药物的耐药。此外, CLSI 推荐的微量肉汤稀释法在多中心重复性研究中, 重复性较低^[14], 可能与该药物 MIC 终点值判断困难有关。通常终点值对应该孔 80% 菌量被抑制, 但在实际操作中, 由于诺卡菌浮于药敏孔表面不易判断抑菌量, 或判读人员经验不足, 极易出现误差。微量肉汤稀释法配合纸片扩散法与 E-test 法, 药敏结果可相互验证, 可避免误差^[15]。本研究中 A151 菌株复方磺胺甲噁唑纸片扩散法抑菌圈直径为 19 mm, 无法判断敏感性, 配合微量肉汤稀释法与 E-test 法, 可以确定其 MIC 值为 1 μg/mL/38 μg/mL, 依据 CLSI M24-A2 的折点范围可判断为敏感。依据 CLSI 标准, 复方磺胺甲噁唑的药敏试验使用的磺胺甲噁唑/甲氧苄啶复方配比为 19:1, 而临床使用的复方磺胺甲噁唑磺胺甲噁唑/甲氧苄啶配比为 5:1。药敏试验复方配比与临床复方制剂配比不同, 可能导致体外药敏结果无法有效预测感染治疗效果。磺胺类药物为浓度依赖型, 需要足够的浓度与对氨基甲酸竞争结合二氢叶酸合成酶, 临床用药参考药敏标准时需要酌情考虑使用量。

4 参考文献

[1] Witebsky FG, Conville PS, Wallace RJ, et al. *Nocardia cyriacigeorgica*--an established rather than an emerging pathogen[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(7): 2469-2470.
[2] Conville PS, Witebsky FG. Organisms designated as *Nocardia aster-*

oides drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(7): 2257-2259.
[3] Kageyama A, Hoshino Y, Yazawa K, et al. *Nocardia cyriacigeorgica* is a significant pathogen responsible for nocardiosis in Japan and Thailand[J]. Mycopathologia, 2005, 160(1): 15-19.
[4] Wei M, Wang P, Qu J, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 11: 183-187.
[5] 王鹏, 隗明, 杨春霞, 等. VITEK MALDI-TOF MS 技术在临床分离诺卡菌快速鉴定中的简易流程优化[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(11): 989-995.
[6] 王辉, 马筱玲, 钱渊, 等. 临床微生物学手册(第 11 版)(Manual of Clinical Microbiology(11th Edition))[M]. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2017: 644.
[7] 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(7): 612-619.
[8] Rodrigueznavia V, Couble A, Devulder G, et al. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2): 536-546.
[9] Glupczynski Y, Berhin C, Janssens M, et al. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(9): 905-912.
[10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2 [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
[11] 杨瑞馥, 陶天申, 方呈祥, 等. 细菌名称双解及分类词典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 570.
[12] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 292.
[13] Conville PS, Witebsky FG. Analysis of multiple differing copies of the 16S rRNA gene in five clinical isolates and three type strains of *Nocardia* species and implications for species assignment[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1146-1151.
[14] Conville PS, Brownelliott BA, Wallace RJ, et al. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1270-1280.
[15] Lowman W, Aithma N. Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4534-4540.

(收稿日期: 2020-06-29)

(本文编辑: 周万青, 刘群)