

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.18

## 河北地区多中心临床分离诺卡菌菌种分布

陈莹<sup>1,2</sup>, 贾艳增<sup>1</sup>, 时东彦<sup>2</sup>, 宋文杰<sup>2</sup>, 史雨微<sup>2</sup>(1.河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017; 2.河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000)

**摘要:**目的 调查河北地区临床分离诺卡菌的菌种分布。方法 收集 2016—2019 年河北地区 10 多家医院临床分离的 94 株诺卡菌, 回顾性分析病例特点; 用 16S rRNA、*secA1* 基因扩增测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 鉴定菌株。结果 94 株诺卡菌经测序鉴定分为圣乔治教堂诺卡菌 39 株、皮疽诺卡菌 21 株、豚鼠耳炎诺卡菌 9 株、巴西诺卡菌 7 株、脓肿诺卡菌 7 株、亚洲诺卡菌 4 株、脓液诺卡菌 2 株、华莱士诺卡菌 2 株、新诺卡菌 1 株、北京诺卡菌 1 株和南非诺卡菌 1 株。MALDI-TOF MS 成功鉴定 80 株诺卡菌到种, 另 4 株亚洲诺卡菌、3 株脓肿诺卡菌、2 株脓液诺卡菌、2 株华莱士诺卡菌、1 株新诺卡菌、1 株北京诺卡菌和 1 株南非诺卡菌未能鉴定到种。呼吸道标本中以圣乔治教堂诺卡菌 (48.5%) 和皮疽诺卡菌 (16.2%) 分离较多; 分泌物标本中以巴西诺卡菌 (25.0%) 和皮疽诺卡菌 (25.0%) 分离较多。结论 临床分离诺卡菌菌种鉴定可以选择质谱技术, 并辅以测序; 不同感染部位诺卡菌的菌种分布不同。

**关键词:**诺卡菌; 临床标本; 菌种分布

**中图分类号:**R446.5

**文献标志码:**A

诺卡菌属于需氧放线菌, 广泛分布于腐生土壤及水和灰尘中, 可造成免疫低下人群感染, 其感染病例报道呈上升趋势<sup>[1]</sup>。随着实验室的诊断技术不断提高, 诺卡菌的分离率愈来愈高, 但是国内关于诺卡菌的地区分布报道不多, 且菌株数量也较少<sup>[2-3]</sup>。本研究收集 2016—2019 年河北地区 10 多家医院分离的诺卡菌菌株, 并对其进行统一鉴定, 结合临床资料探讨其标本分布特征, 以期对诺卡菌的临床诊断提供帮助。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株分离** 收集 2016—2019 年河北地区 10 多家医院 (河北医科大学第二医院、河北省人民医院、河北省中医院、河北省胸科医院、廊坊市人民医院、沧州市中心医院、沧州市中西医结合医院、哈励逊国际和平医院、邢台市人民医院、遵化市人民医院、华北理工大学附属医院、承德医学院附属医院、保定市传染病医院、秦皇岛市第三医院、张家口市第一医院等) 临床分离诺卡菌 94 株, 均为非重复分离株, 结合临床症状和影像学检查确定为致病菌<sup>[1,4]</sup>。94 株诺卡菌分离自下呼吸道标本 68 株 (72.3%)、分泌物标本 20 株 (21.3%)、血液标本 3 株 (3.2%)、肺脓肿标本 1 株 (1.1%)、脑脓肿标本 1 株 (1.1%) 和脑脊液标本 1 株 (1.1%)。分离菌株根据菌落形态和改良抗酸染色进行初步鉴定, 并于 -70 °C 保存。菌株分离患者中位年龄 60 岁, 其中, 男性 52 例, 女

性 42 例。

**1.2 主要试剂及仪器** 去离子水 (天根公司), 研磨小杵、2×Es Taq Master Mix (Dye) (北京康为世纪生物公司); HX-20 恒温金属浴 (上海沪实业公司), HC-2518 高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器公司), 621BR50860 T100 Thermal Cycler、733BR0192 ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad 公司), JY600C 电泳仪 (北京君意东方电泳设备公司), Nano Drop 2000 (超微量) 分光光度计 (Thermo Scientific 公司), ABI 3730XL DNA 测序仪 (Applied Biosystems 公司), Vitek MS 分枝杆菌/诺卡菌试剂盒、Vitek MS 质谱仪 (法国生物梅里埃公司)。

**1.3 菌株 DNA 提取** 取血平板上菌落, 用研磨小杵使诺卡菌乳化分散于 100 μL 去离子水中, 100 °C 煮沸 10 min, 10 625×g 离心 10 min, 取上清液作为模板。用分光光度计评价 DNA 的纯度和含量,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.8$  为合格。

**1.4 基因扩增及测序** 参照文献<sup>[5-6]</sup> 合成 16S rRNA 和 *secA1* 基因扩增引物, 引物序列见表 1, 由上海生工公司合成。PCR 反应体系为 50 μL, 包括 2×Es Taq Master Mix 25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 4 μL, ddH<sub>2</sub>O 17 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。PCR 反应产物经纯化送上海生工公司采用 3730XL DNA 测序仪进行 Sanger 双向测序。序列与

**作者简介:**陈莹, 1995 年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为诺卡菌的流行病学及耐药性分析。

**通信作者:**时东彦, 主任技师, 博士, E-mail: shidongyan73@126.com。

NCBI 的基因库进行 BLAST 比对, 根据 CLSI MM18-A<sup>[7]</sup>, 若 16S rRNA 序列与模式菌相似度  $\geq 99.0\%$ , 且与其他种相似度之差大于 0.8%, 鉴定为种; 若相似度  $< 99.0\%$  或相似度  $\geq 99.0\%$  且与其他种相似度之差小于 0.8%, 则进行 *secA1* 序列分析与模式菌相似性达到  $\geq 99.0\%$  鉴定到种。

表 1 16S rRNA 及 *secA1* 基因 PCR 扩增引物及产物大小

基因名称	序列(5'→3')	产物 (bp)
16S rRNA	F:AGTTTGATCCTGGCTCAG R:GGAGGTGATCCAGCCGCA	1 500
<i>secA1</i>	F:GACAGYGAGTGGATGGGYCGSGTGCACCG R:GCGGACGATGACTCCTTGTCT	439

**1.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 鉴定** 取一环待测菌加入含 0.5 mm 玻璃珠和 500  $\mu\text{L}$  70% 乙醇的 1.5 mL 离心管中, 震荡 5 min, 室温放置 10 min, 将菌悬液转入 2 mL 离心管中, 10 625 $\times g$  离心 2 min, 弃上清液, 向沉淀

中加入 10  $\mu\text{L}$  70% 甲酸并室温放置 5 min, 加入 10  $\mu\text{L}$  乙腈混匀, 10 625 $\times g$  离心 2 min, 取 1  $\mu\text{L}$  上清液涂于靶板, 待干燥加入 1  $\mu\text{L}$  基质, 干燥后进行 MS 分析。校准菌株: 大肠埃希菌 ATCC 8739。鉴定值 99.9% 则鉴定到种; 无鉴定结果或鉴定值小于 99.9%, 则无法鉴定到种。

## 2 结果

**2.1 诺卡菌菌株鉴定结果** 94 株诺卡菌经基因测序全部鉴定到种, 80 株 (85.1%) 经 MALDI-TOF MS 成功鉴定到种, 见表 2。MALDI-TOF MS 未鉴定到种的包括 3 株脓肿诺卡菌 (无鉴定值)、4 株亚洲诺卡菌 (无鉴定值)、2 株脓液诺卡菌 (无鉴定值)、2 株华莱士诺卡菌 (无鉴定值)、1 株新诺卡菌 (50% 鉴定值)、1 株北京诺卡菌 (无鉴定值) 和 1 株南非诺卡菌 (无鉴定值)。

表 2 94 株诺卡菌菌种分布

菌种	测序鉴定	质谱鉴定	质谱鉴定比例 (%)
圣乔治教堂诺卡菌 ( <i>N. cyriacigeorgica</i> )	39	39	100
皮疽诺卡菌 ( <i>N. farcinica</i> )	21	21	100
豚鼠耳炎诺卡菌 ( <i>N. otitidiscalearum</i> )	9	9	100
巴西诺卡菌 ( <i>N. brasiliensis</i> )	7	7	100
脓肿诺卡菌 ( <i>N. abscessus</i> )	7	4	57.1
亚洲诺卡菌 ( <i>N. asiatica</i> )	4	0	0
脓液诺卡菌 ( <i>N. puris</i> )	2	0	0
华莱士诺卡菌 ( <i>N. wallacei</i> )	2	0	0
新诺卡菌 ( <i>N. nova</i> )	1	0	0
北京诺卡菌 ( <i>N. beijingensis</i> )	1	0	0
南非诺卡菌 ( <i>N. transvalensis</i> )	1	0	0

**2.2 不同部位诺卡菌的分离情况** 68 份下呼吸道标本分离菌种分别为圣乔治教堂诺卡菌 33 株 (48.5%)、皮疽诺卡菌 11 株 (16.2%)、豚鼠耳炎诺卡菌 8 株 (11.8%)、脓肿诺卡菌 4 株 (5.9%)、亚洲诺卡菌 4 株 (5.9%)、巴西诺卡菌 2 株 (2.9%)、华莱士诺卡菌 2 株 (2.9%)、脓液诺卡菌 1 株 (1.5%)、南非诺卡菌 1 株 (1.5%)、北京诺卡菌 1 株 (1.5%) 和新诺卡菌 1 株 (1.5%)。20 份分泌物标本分离菌种分别为巴西诺卡菌 5 株 (25.0%)、皮疽诺卡菌 5 株 (25.0%)、圣乔治教堂诺卡菌 4 株 (20.0%)、脓肿诺卡菌 3 株 (15.0%)、豚鼠耳炎诺卡菌 2 株 (10.0%) 和脓液诺卡菌 1 株 (5.0%)。3 份血液标本分离菌种分别为皮疽诺卡菌 2 株 (66.7%) 和圣乔治教堂诺卡菌 1 株 (33.3%)。肺脓肿标本、脑脓肿标本和脑脊液标本分离菌种均为皮疽诺卡菌。

## 3 讨论

诺卡菌生长缓慢, 生化反应不活泼, 其菌种鉴定效果不佳。质谱技术可解决部分诺卡菌的鉴定, 但在某些种的鉴定上仍需依靠分子测序技术<sup>[8]</sup>。本研究 94 株临床分离诺卡菌经质谱鉴定至种的占 85.1%, 脓液诺卡菌、亚洲诺卡菌、南非诺卡菌在本研究使用的质谱鉴定系统中缺乏鉴定数据库; 而对于脓肿诺卡菌嗜琼脂生长特点, 蛋白质提取时可能存在琼脂的干扰而导致质谱图谱分辨率降低; 非洲诺卡菌和新诺卡菌属于新诺卡菌群, 华莱士诺卡菌和南非诺卡菌属于南非菌群, 质谱无法有效区分。94 株临床分离诺卡菌采用 16S rRNA 测序鉴定至种的占 97.9%, 有 2 株华莱士诺卡菌补充 *secA1* 序列后成功鉴定。16S rRNA 基因序列中物种间多态性不够, 某些亲缘关系较近物种可能无法进行区分, 而对

于南非诺卡菌复合群, *secA1* 具有更多的物种间多态性, 在识别南非诺卡菌和华莱士诺卡菌中可作为 16S rRNA 的补充鉴定<sup>[6]</sup>。

94 株临床分离诺卡菌包括 11 个诺卡菌种。圣乔治教堂诺卡菌分离率最高, 其次为皮疽诺卡菌和豚鼠耳炎诺卡菌。美国临床分离率最高菌种为新诺卡菌, 其次皮疽诺卡菌和巴西诺卡菌<sup>[9]</sup>; 加拿大最主要流行菌种是新诺卡菌, 圣乔治教堂诺卡菌和皮疽诺卡菌较多<sup>[10]</sup>; 澳大利亚主要分离菌种为新诺卡菌、圣乔治教堂诺卡菌、巴西诺卡菌和皮疽诺卡菌<sup>[11]</sup>; 法国最常见分离菌种为皮疽诺卡菌、脓肿诺卡菌、新诺卡菌、圣乔治教堂诺卡菌<sup>[12]</sup>; 而泰国, 皮疽诺卡菌、北京诺卡菌和圣乔治教堂诺卡菌是主要分离诺卡菌种<sup>[13]</sup>。北京朝阳医院圣乔治教堂诺卡菌临床分离率最高, 皮疽诺卡菌次之<sup>[2]</sup>。以上各个文献表明, 不同国家菌种分布有所不同, 美国和澳大利亚最常见分离菌种为新诺卡菌, 而法国和泰国最常见分离菌种为皮疽诺卡菌, 而北京朝阳医院和本研究报道以圣乔治教堂诺卡菌最常见。

本研究分离的诺卡菌中以呼吸道标本占比最高, 达到 72.3%, 其次为分泌物标本(21.3%)。而呼吸道标本分离率最高的是圣乔治教堂诺卡菌, 其次为皮疽诺卡菌, 第 3 位为豚鼠耳炎诺卡菌。分泌物标本中分离率最高的是皮疽诺卡菌和巴西诺卡菌, 其次为圣乔治教堂诺卡菌。梅奥医学中心分离率最高的部位是呼吸道, 其中最常分离新诺卡菌、圣乔治教堂诺卡菌和皮疽诺卡菌<sup>[14]</sup>。西班牙临床分离菌株中 85.9% 分离于呼吸道, 以圣乔治教堂诺卡菌和新诺卡菌常见<sup>[15]</sup>。诺卡菌的临床感染部位多数国家以肺部感染常见, 皮肤感染次之; 不同的标本类型菌种分布也不相同。了解诺卡菌的地区性分布及不同样本来源菌种分布, 对临床经验性用药具有指导意义。

#### 4 参考文献

- [1] Fatahi-Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017[J]. Microb Pathog, 2018, 114: 369-384.
- [2] Wei M, Wang P, Qu J, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital in China [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 11: 183-187.
- [3] Yi M, Wang L, Xu W, et al. Species distribution and antibiotic sus-

- ceptibility of *Nocardia* isolates from Yantai, China[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 3653-3661.
- [4] Wilson J W. Nocardiosis: Updates and clinical overview[J]. Mayo Clin Proc, 2012, 87(4): 403-407.
- [5] Torres RD, Oletta CA, Zlotnik H. A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *Nocardia* spp[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1996, 3(5): 601-604.
- [6] Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2760-2766.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing-Approved guideline. Document MM18-A[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [8] Carrasco G, de Dios CJ, Garrido N, et al. Shortcomings of the commercial MALDI-TOF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia* species[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 542.
- [9] Uhde KB, Pathak S, Mccullum IJ, et al. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, United States, 1995-2004 [J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(12): 1445-1448.
- [10] Tremblay J, Thibert L, Alarie I, et al. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008 [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5): 690-696.
- [11] Tan YE, Chen SC, Halliday CL. Antimicrobial susceptibility profiles and species distribution of medically relevant *Nocardia* species: results from a large tertiary laboratory in Australia[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 20: 110-117.
- [12] Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, et al. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015 [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(4): 489-495.
- [13] Poonwan N, Mekha N, Yazawa K, et al. Characterization of clinical isolates of pathogenic *Nocardia* strains and related actinomycetes in Thailand from 1996 to 2003[J]. Mycopathologia, 2005, 159(3): 361-368.
- [14] Hamdi AM, Fida M, Deml SM, et al. Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility profiles of *Nocardia* species from a tertiary hospital and reference laboratory, 2011 to 2017[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(3): e01868-19.
- [15] Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, et al. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(3): 754-761.

(收稿日期: 2020-08-17)

(本文编辑: 周万青, 刘群)