

11株临床诺卡菌16S rRNA及药敏分析*

刘涛华**，王颜颜，牟丽丽，吕倩，陈燕，张荣庆，康颖倩***

(贵州医科大学微生物学教研室，贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的：探讨应用11株临床诺卡菌16S rRNA序列鉴定该菌菌种名，同时观察该菌的药敏情况。方法：将11株临床分离的诺卡菌菌株分别接种于脑心浸液琼脂培养基分离培养，观察其生长情况；提取菌株DNA，聚合酶链式反应(PCR)扩增其16S rRNA序列，并测定其基因序列，所获序列与GenBank数据库进行BLAST比对，鉴别其菌种名；采用Kirby-Bauey纸片扩散法检测11株菌株药敏情况。结果：11株临床诺卡菌在脑心浸液琼脂培养基上生长迅速；PCR扩增菌株16S rRNA基因序列经BLAST比对，结果与GenBank中已知的诺卡菌同源性>98%，分离的菌株分别为 *Nocardia otitidiscaviarum* 4株、*Nocardia cyriacigeorgica* 3株、*Nocardia wallacei* 1株及 *Nocardia farcinica* 3株；药敏实验结果显示11株诺卡菌均对阿米卡星敏感，对亚胺培南耐药，其中 *Nocardia cyriacigeorgica* 对氨苄西林、环丙沙星、克拉霉素及阿莫西林的药物敏感性结果与其它菌株截然不同。结论：测定16S rRNA序列能够快速、简便、准确地鉴定诺卡菌菌种，各菌株均对阿米卡星敏感，对亚胺培南耐药。

[关键词] 诺卡菌；放线菌；16S rRNA；聚合酶链式反应；序列分析；DNA；药敏试验

[中图分类号] R378；R519 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)03-0268-04

Identification and Drug Susceptibility Test of 11 Clinical *Nocardia* Strains

LIU Taohua, WANG Yanyan, MOU Lili, LYU Qian, CHEN Yan, ZHANG Rongqing, KANG Yingqian
(Department of Microbiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the characteristics and susceptibility of the *Nocardia* by molecular genotyping method. **Methods:** Eleven clinical strains were inoculated in Brain Heart Infusion Agar medium separately and growth condition was observed. DNA was extracted and sequenced by PCR. Tested sequence was compared with GenBank Database by BLAST and identified its species name. The drug susceptibility of 11 strains was tested by Kirby - Bauev method. **Results:** The strains grew rapidly in Brain Heart Infusion Agar medium. The DNA homology of 16S rRNA genes compared with the *Nocardia* strain known in GenBank were higher than 98% respectively. The collected clinical strains were *Nocardia otitidiscaviarum* (4 strains), *Nocardia cyriacigeorgica* (3 strains), *Nocardia wallacei* (1 strain) and *Nocardia farcinica* (3 strains). All these strains were sensitive to amikacin and resistant to imipenem. Of which, *Nocardia cyriacigeorgica* demonstrated complete different drug susceptibility from other strains against ampicillin, ciprofloxacin, clarithromycin and amoxicillin. **Conclusion:** DNA sequencing analysis is a fast, simple, and accurate way to identify *Nocardia*. Tested strains are susceptible to amikacin and resistant to imipenem.

[Key words] *Nocardia*; actinomycetes; 16S rRNA; polymerase chain reaction; sequence analysis; DNA; drug susceptibility test

* [基金项目] 国家自然科学基金地方项目(31060006, 31260029); 贵州省社会发展科技攻关项目[黔科合SY字(2011)3017号]; 贵州省卫生厅科技项目(gzkwj2010-1-025); 贵阳市科技局社会发展与民生计划(筑科合同[2011103]16号)

** 贵州医科大学2013级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: joycekangtokyo@qq.com

网络出版时间: 2016-03-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1042.036.html>

诺卡菌(*Nocardia*)为需氧菌,广泛存在于土壤、海水、淡水及尘埃中,属放线菌目,棒状杆菌亚目,诺卡菌科,诺卡菌属,其中对人致病的主要是星形诺卡菌,其次是巴西诺卡菌^[1]。星形诺卡菌主要经呼吸道或伤口感染人体,可引起肺部化脓性炎症及坏死,或引起皮下慢性化脓性肉芽肿^[2]。尤其在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、肿瘤及其他免疫力低下者,易通过血行播散引起脑膜炎、脑脓肿等严重并发症^[3]。部分致病的诺卡菌感染人体后引起的临床症状与结核分枝杆菌或非结核分枝杆菌感染的临床症状相似,容易造成误诊^[4],因此快速、准确的鉴定诺卡菌尤为重要。本研究通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 11 株诺卡菌 16S rRNA 序列并测定其序列,鉴定诺卡菌菌种名,同时,初步探讨被测的诺卡菌药物敏感情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

研究所用的 11 株诺卡菌来源于上海 4 株,江苏 3 株,北京、广东、河南和湖北各 1 株,所致疾病和患者年龄见表 1。

表 1 11 株诺卡菌菌株的基本情况

Tab.1 The general information of 11 strains

编号	来源	所致疾病	患者年龄
BJ01	北京	肺部感染	63
GZ01	广东	肺部感染	41
NJ01	江苏	肺部感染	37
NJ02	江苏	肺部感染	37
SH01	上海	肺部感染	24
HN01	河南	肺部感染	38
NJ03	江苏	肺部感染	37
HB01	湖北	肺部感染	29
SH02	上海	肺部感染	57
SH03	上海	肺部感染	88
SH04	上海	肺部感染	60

1.2 菌株分离培养

将收集到的 11 株诺卡菌接种于脑心浸液琼脂培养基上,28 ℃ 培养 48 ~ 72 h,划线法分离单菌落,挑取单个菌落传代培养。

1.3 16S rRNA 基因扩增、测序及 BLAST 比对

微波法提取菌株 DNA^[5],进行 PCR 扩增。引物使用细菌 16S rRNA 扩增,通用引物 27 f 序列为 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,1492 r 序列为 GGT-TACCTTGTTACGACTT,由上海生工生物工程股份

有限公司合成。扩增体系为 2 × PCR Mix 13 μL, ddH₂O 10 μL,上游引物、下游引物和模板 DNA 各 1 μL, MgCl₂ 1 μL^[6]。循环条件为:95 ℃ 预变性 4 min,95 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 90 s(35 个循环),最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取 PCR 产物,采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,凝胶成像系统观察电泳结果。PCR 产物由立菲生物技术有限公司进行 DNA 序列测定,将所获得的序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,比对结果按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 的菌株归于同一物种^[7]。

1.4 药敏试验

采用 Kirby-Bauey 纸片扩散法进行药物敏感性试验,操作和结果判读标准参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)制订的标准(表 2):将所有菌株分别传于脑心浸液琼脂培养基上,28 ℃ 培养 48 h,菌液浓度为 0.5 麦氏浊度,分光光度值在 0.08 ~ 0.10,调好浊度的菌悬液 15 min 内均匀涂布 Mueller-Hinton agar plate (MH) 平板。放置 5 min,无菌镊子贴相应的药敏纸片,保持纸片间距大于 40 mm,28 ℃ 培养 48 h 观察培养板中抑菌圈生长情况并记录结果^[8-9]。

表 2 药片含量和敏感判断标准

Tab.2 Content of antibiotics and susceptibility criteria

抗菌素	纸片含量 (μg/片)	抑菌圈直径(mm)		
		耐药	中介	敏感
氨苄西林	10	≤13	14 ~ 16	≥17
环丙沙星	5	≤15	16 ~ 20	≥21
卡那霉素	30	≤13	14 ~ 17	≥18
亚胺培南	10	≤19	20 ~ 22	≥23
克拉霉素	15	≤10	11 ~ 12	≥13
阿莫西林	20	≤13	14 ~ 17	≥18
阿米卡星	30	≤14	15 ~ 16	≥17
庆大霉素	10	≤12	13 ~ 14	≥15
红霉素	15	≤15	16 ~ 20	≥21
四环素	30	≤11	12 ~ 14	≥15

2 结果

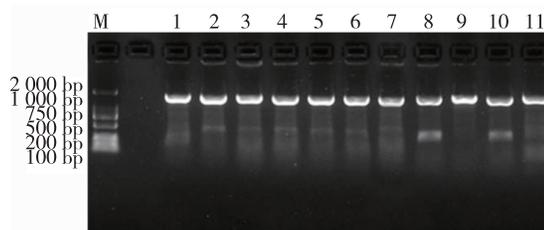
2.1 16S rRNA 序列分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 扩增片段大小为 1 400 bp(见图 1)。将 16S rRNA 序列测序结果(图 2)与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对(图 3),鉴定菌种,所收集到的 11 株菌株与 GenBank

中已知的诺卡菌同源性 >98% ,属于同一菌种。分离的菌株分别为 *Nocardia otitidiscaviarum* (GZ01、NJ01、SH01 和 SH02) , *Nocardia cyriacigeorgica* (NJ03、HB01 和 HN01) , *Nocrdia wallacei* (SH04) , *Nocardia farcinica* (BJ01、NJ02 和 SH03) 。

2.2 药敏实验

结果显示,各菌株均对阿米卡星敏感,对亚胺培南耐药,其中 *Nocardia cyriacigeorgica* 对氨苄西林、环丙沙星、克拉霉素及阿莫西林的药物敏感性结果与其它菌株截然不同。见表 3。



注:M 为 Marker,1 ~ 11 为收集的诺卡菌
图 1 诺卡菌 16S rRNA 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of amplification product of 16S rRNA gene

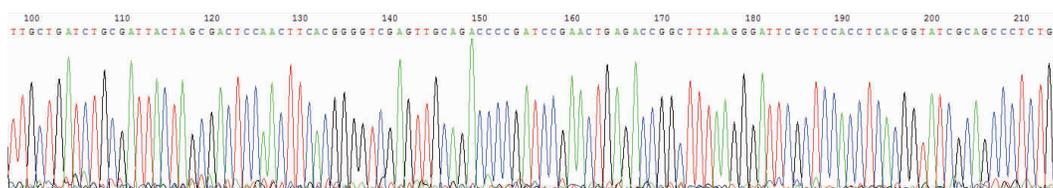


图 2 SH04 菌株 16S rRNA 序列测定
Fig. 2 Sequence detection of 16S rRNA gene of SH04

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia wallacei</i> strain AB137 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2553	2553	100%	0.0	99%	KC677696.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia wallacei</i> strain W8083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2553	2553	100%	0.0	99%	NR_117397.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia transvalensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:IFM.0396	2553	2553	100%	0.0	99%	AB084444.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia</i> sp. ATCC 49872 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2553	2553	100%	0.0	99%	AY155203.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia wallacei</i> strain APN00024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2547	2547	100%	0.0	99%	KC262102.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia transvalensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:IFM.0513	2547	2547	100%	0.0	99%	AB084446.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia transvalensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:IFM.0505	2547	2547	100%	0.0	99%	AB084445.1
<input type="checkbox"/> <i>Nocardia wallacei</i> strain SB-B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2543	2543	99%	0.0	100%	KC594049.1

图 3 SH04 菌株 BLAST 比对结果
Fig. 3 BLAST comparison results of SH04

表 3 药敏实验判定结果

Tab. 3 Result of susceptibility test

抗生素	菌种名称			
	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Nocardia wallacei</i>
氨苄西林	耐药	敏感	耐药	耐药
环丙沙星	敏感	耐药	敏感	敏感
卡那霉素	敏感	中度	敏感	敏感
亚胺培南	耐药	耐药	耐药	耐药
克拉霉素	敏感	耐药	中度	敏感
阿莫西林	耐药	敏感	耐药	耐药
阿米卡星	敏感	敏感	敏感	敏感
庆大霉素	敏感	敏感	耐药	耐药
红霉素	中度	耐药	耐药	耐药
四环素	中度	中度	敏感	耐药

3 讨论

诺卡菌所致疾病可发生于任何种族、职业及年龄的人群,且临床症状复杂多样,主要引起肺部、皮肤感染及慢性化脓性或肉芽肿性病变,严重时甚至导致患者死亡。对人致病的主要是外源性感染星形诺卡菌,其次是巴西诺卡菌。星形诺卡菌主要经呼吸道或伤口感染人体,可引起肺部化脓性炎症及坏死,症状与肺结核相似。本研究所收集到的临床放线菌主要来自北京、上海、广东等医学水平较高的地区,一方面是由于诺卡菌感染并不常见,多发生在免疫功能障碍或合并其他进行性疾病的患者;另一方面则是由于国内医生对诺卡菌感染还没有得到充分重视,其引起的感染不易与肺结核、肺

脓肿、真菌感染相互区分。因此寻找一种快速、准确的鉴定方法尤为重要。病原菌鉴定有多种方法,如形态学观察、血清分型、生化分析、遗传学分析等。遗传学分析法又包括基因序列分析、核酸分子杂交及分子标记检测等。16S rRNA 基因在基因序列分析中应用最多^[10]。

本研究通过 PCR 方法扩增国内分离的 11 株临床表形鉴定为诺卡菌属菌株的 16S rRNA 序列并与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,所测定序列与已知的诺卡菌同源性 >98%,归于同一菌种。比对结果显示分离的菌株分别为 *Nocardia otitidiscaviarum* (GZ01、NJ01、SH01 和 SH02), *Nocardia cyriacigeorgica* (NJ03、HB01 和 HN01), *Nocardia wallacei* (SH04), *Nocardia farcinica* (BJ01、NJ02 和 SH03)。其中 *Nocardia otitidiscaviarum* 一般引起脑脓肿及肺部感染^[11]。相比于其他诺卡菌,该种引起感染相当罕见。药敏结果显示该菌耐氨基苄西林、亚胺培南及阿莫西林等 β -内酰胺类抗生素,对庆大霉素、阿米卡星等氨基糖苷类抗生素敏感,与文献报道的相符^[12]。本研究中共收集到 3 株 *Nocardia cyriacigeorgica*,分别来自南京、湖北、河南,均引起肺部感染。药敏结果显示该菌对庆大霉素、阿米卡星、阿莫西林和氨基苄西林敏感,对卡那霉素和四环素中度敏感,对红霉素、环丙沙星、亚胺培南和克拉霉素耐药,与文献报道的相符^[13]。*Nocardia wallacei* 为临床条件致病菌,可通过吸入或直接皮肤进入机体。其对磺胺类药物耐药^[14]。药敏结果显示该菌对阿米卡星、卡那霉素、环丙沙星和克拉霉素敏感,对庆大霉素、红霉素、四环素、阿莫西林、亚胺培南和氨基苄西林耐药。*Nocardia farcinica* 是一种罕见的病原体,曾分离自蜂窝组织炎患者,主要影响免疫功能低下的患者^[15],可引起局部性或播散性的感染,若没有及时的诊断和适当的处理还可能危及病人的生命。此菌耐大多数 β -内酰胺类抗生素,对阿米卡星、亚胺培南、甲氧苄啶磺胺甲恶唑、第三代头孢素以及氟喹诺酮类耐药^[16]。

综上,测定 16S rRNA 序列能够快速、简便、准确地鉴定诺卡菌,各菌株均对阿米卡星敏感,对亚胺培南耐药。

4 参考文献

[1] 马英,吴湜,黄海辉,等. 放线菌与诺卡菌所致感染性皮肤肉芽肿的鉴别诊断及治疗[J]. 微生物与感染,

2015(2): 92-97.

- [2] Maggiorelli C, Di Pierro I, Manta C, et al. Nocardia and Lungs in COPD: Beyond Immuno-deficiencies [J]. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2015(3): 321-326.
- [3] Brown-Elliott BA, Biehle J, Conville PS, et al. Sulfonamide resistance in isolates of Nocardia spp. from a US multicenter survey [J]. Journal of clinical microbiology, 2012(3): 670-672.
- [4] 刘爱梅. 艾滋病合并非结核分枝杆菌病 28 例临床分析[J]. 临床合理用药杂志, 2009(15): 98-99.
- [5] 徐平,李文均,徐丽华,等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003(4): 82-84.
- [6] 金方,陈玉如,王颜颜,等. 放线菌 16S rDNA 片段扩增方法的优化[J]. 贵州医药, 2014(6): 483-486.
- [7] 金方,刘涛华,牟丽丽,等. 贵州地区土壤中需氧放线菌的分离鉴定[J]. 贵州农业科学, 2015(3): 114-117.
- [8] M100-S18 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Eighteenth informational supplement, 2008: 19-131.
- [9] 康颖倩,牟丽丽,周晓明,等. 新生儿肠炎粪肠球菌 16S rRNA 鉴定分析[J]. 贵阳医学院学报, 2014(6): 805-808.
- [10] 刘大佳,杨明,陈利玉,等. 采用 16S rRNA 基因分析技术鉴定正畸患者矫治前龈沟液的细菌种类[J]. 中国现代医学杂志, 2016(2): 43-46.
- [11] Huang CH, Hsueh PR, Chen YH. Empyema thoracis due to Nocardia otitidiscaviarum [J]. Journal of microbiology, immunology, and infection, 2015(5): 580.
- [12] Ishihara M, Takada D, Sugimoto K, et al. Primary brain abscess caused by Nocardia otitidiscaviarum [J]. Internal Medicine, 2014(17): 2007-2012.
- [13] Yagi K, Ishii M, Namkoong H, et al. Pulmonary nocardiosis caused by Nocardia cyriacigeorgica in patients with Mycobacterium avium complex lung disease: two case reports [J]. BMC infectious diseases, 2014(1): 684.
- [14] Cassir N, Million M, Noudel R, et al. Sulfonamide resistance in a disseminated infection caused by Nocardia wallacei: a case report [J]. J Med Case Rep, 2013(1): 103.
- [15] Tsukamura M, Ohta M. Nocardia farcinica as a pathogen of lung infection [J]. Microbiology and immunology, 1980(3): 237-241.
- [16] De Nardo P, Giancola ML, Noto S, et al. Left thigh phlegmon caused by Nocardia farcinica identified by 16S rRNA sequencing in a patient with leprosy: a case report [J]. BMC infectious diseases, 2013(1): 162.

(2015-11-30 收稿, 2016-02-05 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅