

富西亚分枝杆菌从血液与静脉插管中的分离与鉴定^{*}

鄂顺梅¹, 屈平华¹, 黄 彬^{2△}, 陈 茶¹, 张 妮³, 袁 慧³, 吴河森⁴ (1. 广东省中医院检验科, 广州 510006; 2. 中山大学附属第一医院检验科, 广州 510080; 3. 广东中医药大学, 广州 510405; 4. 广东医学院医学检验系, 广东湛江 524023)

【摘要】 目的 对从同一患者血液和静脉插管中分离的两株抗酸阳性细菌 B0793、V1948 进行菌种鉴定。**方法** 广谱 PCR 扩增细菌的 16S 核糖体核糖核酸(16S rRNA)基因与核糖核酸(RNA)聚合酶 β 亚单位(*rpoB*)基因, 测序其核苷酸序列并与相关菌种进行同源性比对及系统发育分析, 以传统的表型实验对基因鉴定的结果进行验证, 并参考 CLSI M24-A 的方法和解释标准进行分离株抗菌药物的药物敏感性试验。**结果** 该 2 株细菌均为血平板上生长缓慢的草兰染色着色较淡的抗酸阳性杆菌, 但 2 株细菌的菌落形态差别较大, B793 在血平板培养 4 d 形成直径 1 cm、米黄色、圆形、突起、不溶血、易乳化的光滑型菌落, V948 则为直径约 2 cm、米黄色、豆腐渣样、边缘不规则的粗糙型菌落。16S rRNA 基因和 *rpoB* 基因序列与富西亚分枝杆菌(*mycobacterium phocaicum*)的同源性均在 99% 以上, 其半定量触酶、68 °C 触酶试验、5% NaCl 耐受试验与脲酶试验阴性, 亦符合富亚分枝杆菌的特征。**结论** 该 2 株抗酸阳性细菌在分类学上属于富西亚分枝杆菌, 其光滑型/粗糙型菌落变异为国际上首次发现。

【关键词】 分枝杆菌; 16S 核糖体核糖核酸; 聚合酶 β 亚单位; 序列分析

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 15. 002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)15-1827-03

Identification and characterization of mycobacterium phocaicum from blood and vein^{*} E Shun-mei¹, QU Ping-hua¹, HUANG Bin^{2△}, CHEN Cha¹, ZHANG Ni³, YUAN Hui³, WU He-sen⁴ (1. Department of Laboratory Medicine, The Tradition Chinese Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

【Abstract】 Objective To identify the two acid-fast strains(B0793 and V1948) which were isolated from blood and vein of the same patient. **Methods** 16S rRNA and *rpoB* gene of two isolates were amplified by PCR and sequenced. The *rpoB* gene sequences of the above isolates were analyzed and phylogenetic tree was constructed. Verification of isolates was carried out with the traditional phenotype results, interpretation of antibiotic susceptibility with CLSI M24-A reference method. **Results** The organisms were acid-fast and Gram-positive bacilli. Colonies grow slowly on 5% sheep blood agar. But morphology difference between two strains was bigger, B0793 form 1 cm size, rice, round, bumps, no hemolysis, smooth, easy emulsion type colonies, V1948 was about 2 cm in diameter size, rice, shoddy kind, edge irregular rough type colonies. The comparative study of 16S rRNA gene and *rpoB* showed the strain with above 99% homology to mycobacterium phocaicum, half quantitative catalase negative, 68 °C catalaset negative, 5% NaCl tolerance test negative and urease test negative, also accorded with the characteristics of mycobacteria phocaicum. **Conclusion** The two strains of bacteria are identified as mycobacterium phocaicum that's smooth /rough type variation is found for the first time.

【Key words】 mycobacterium; 16s rRNA; *rpoB*; sequence analysis

分枝杆菌(*mycobacteria*)是一类高 G+C 含量、需氧、不形成芽孢、无动力的抗酸阳性杆菌, 隶属于放线菌目(*actinomycetales*)^[1]。本属细菌的主要特点是细胞壁含有大量脂质, 其革兰染色时结合结晶紫的能力差、甚至不着色; 然而, 分枝杆菌因细胞壁缺乏革兰阴性菌的外膜蛋白(*outer membrane*), 仍归类为革兰阳性杆菌的范畴。按照在理想的培养条件下的生长速度, 分枝杆菌分为缓慢生长、快速生长和人工培养条件下不生长三大类。缓慢生长分枝杆菌在固体培养基上需要 7 d 以上才能形成肉眼可见的菌落, 快速生长分枝杆菌(*rapidly growing mycobacteria*, RGM)则通常无需 7 d。在已发现的 150 多个分枝杆菌中, 大概有 60 多个菌种为快速生长的分枝杆菌, 并且, 大多数菌种与人类疾病密切相关。近年来, 由于快速生长

分枝杆菌在艾滋病患者和免疫缺陷患者群中的感染日益增加, 引起临床的密切关注^[2]。

传统的表型分析对鉴定分枝杆菌有一定作用, 但操作相对繁琐、费时, 且不能将分枝杆菌正确鉴定到种的水平。分枝杆菌的确切鉴定还依赖于非常规的分子生物学方法, 最显著的方法就是 16S 核糖体核糖核酸(16S rRNA)基因测序。然而, 由于 16S rRNA 基因的保守性, 其对于菌种的分辨率低, 如偶发分枝杆菌群(*M. fortuitum* group)、龟-脓肿分枝杆菌群(*M. chelonae-M. abscessus* group)等, 其分别包含多个种, 且种与种之间的 16S rRNA 基因的同源性均在 99% 以上^[3-4]。本研究采用细菌的 16S rRNA 与核糖核酸(RNA)聚合酶 β 亚单位(*rpoB*)基因序列分析的方法, 最终鉴定了 1 例富西亚分枝杆

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助课题(No. 30770935)。 Δ 通讯作者, E-mail: hb906@163.com。

菌的临床感染,并且首次发现了富西亚分枝杆菌的 S/R 型变异,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男,30 岁,慢性肾衰竭、尿毒症、继发性肾性贫血。血液透析史 6 年,长期右颈内静脉插管,既往有反复低热、寒战的导管相关性感染病史。2011 年 3 月因血液透析后低热于本院门诊就诊,自述疲乏、寒战、伴乏力,无咳嗽、咳痰、腹痛、腹泻,插管处无红肿、流脓。白细胞(WBC) $6.18 \times 10^9/L$,N 75%,血红蛋白(Hb) 69 g/L,血细胞压积(HCT) 0.213,血小板(PLT) 115×10^9 ,考虑为导管相关感染。血培养、静脉导管进行细菌培养,均培养出快速生长分枝杆菌,头孢吡肟封管,莫西沙星、头孢吡肟口服抗感染后好转,无发热。

1.2 仪器与试剂 TE 9600 基因扩增仪(珠海黑马公司);恒温金属浴器(杭州博日公司);Baso 快速革兰染色液和 Baso 快速抗酸染色液(台湾 BASO 珠海公司),Bact/ALERT 3D120 全自动血培养仪及配套的需氧血培养瓶(法国梅里埃公司),Premix Ex Taq 酶体系(大连 Takara 公司)。细菌分离培养基:血平板、巧克力平板、麦康凯平板购自江门凯林;抗菌药物药敏试剂购自珠海迪尔。

1.3 标本的采集及处理 血培养采用法国梅里埃公司的 Bact/ALERT 3D120 全自动血培养仪,及配套专用的需氧增菌培养瓶。无菌抽取患者血液标本 10 mL,35℃ 孵育,报警阳性则接种血平板、巧克力平板。导管头接种及处理:静脉插管的导管头按《全国临床检验操作规程》第 3 版的方法:将 5 cm 的导管在血平板上交叉滚动 4 次,然后弃之,孵育后如血琼脂平板上生长菌落数大于 15 个有意义。

1.4 传统表型鉴定 革兰染色、抗酸染色按说明书操作进行。半定量触酶、68℃ 触酶试验、5% NaCl 耐受试验、脲酶、麦康凯生长试验等均参考《临床微生物学手册》^[5]。

1.5 16S rRNA 基因测序及序列分析 16S rRNA 基因、*rpoB* 基因的扩增按参考文献[6-7]。扩增产物经电泳检测后,PCR 产物送与上海英韦创津广州公司进行基因测序。获得的 16S rRNA 基因序列递交 GenBank 数据库。在该数据库中,Blast 同源性比对初步确定其分类位置,下载相关菌种的基因序列,Cluster X 软件进行序列的同源性分析,Mega 4.0 软件构建系统发生树。

1.6 药物敏感性试验 采用珠海迪尔公司提供的微量肉汤稀释法 96 孔药敏板。药物的选择参照 CLSI 2003 快速分枝杆菌与需氧放线菌的推荐药物。将待测菌株于血平板培养基 48 h 后,用生理盐水重悬,分 4 个步骤制备菌悬液:(1)加入 7~10 颗 3 mm 磁珠在涡旋振荡器上磨菌 5~10 min 后,静置 10~15 min,取上层均匀的悬液用液体培养基比浊至 0.5 mol(相当于 1.5×10^8 CFU/mL)待用;(2)取步骤 1 的 0.5 mL 菌液加入 4.5 mL 的无菌生理盐水稀释菌液到 1.5×10^7 CFU/mL 混匀;(3)取步骤 2 菌液 4 mL 加入 36 mL 的无菌生理盐水稀释到 1.5×10^6 CFU/mL;(4)取步骤 3 菌液 0.01 mL 加入 0.1 mL 的培养液稀释到 1.5×10^5 CFU/mL。菌液制备完毕,取出药敏板,在含药物的 96 孔 U 型板中,每孔加入稀释 100 μ L 含菌液的液体培养基,同时设置 100% 菌落生长对照孔、阴性对照孔、贴上封板膜,把剩余含菌肉汤接种血平板(此过程为质控过程,检测肉汤中菌的纯度),两者均在 35℃ 培养,每天观察一次结果连续观察 3 d 后,确定其最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。

2 结果

2.1 血培养、静脉插管的培养结果 血培养瓶在增菌培养的

第 3 天出现阳性报警,二次转种后 CO₂ 培养箱 35℃ 培养 24 h 未见细菌生长现象,48 h 出现缓慢生长细菌;静脉插管在亦在 48 h 出现缓慢生长的小菌落,且血平板菌落总数大于 100 个,按《全国临床检验操作规程》第 3 版,其具有显著的临床意义。根据其标本编号,该两株菌分别命名为:B0793、V1948。培养 72 h 后,B0793 形成米黄色、圆形、突起的光滑型菌落,取其少量涂布生理水中,菌落易乳发,并迅速散开并在盐水表面浮出一层油脂颗粒;V1948 则为灰白色、豆腐渣样、边缘不规则的粗糙型菌落,见图 1。

2.2 B0793 与 V1948 的生化鉴定 革兰染色着色不良、抗酸阳性的杆菌,能在麦康凯平板上生长良好,其半定量触酶、68℃ 触酶试验、5% NaCl 耐受试验与脲酶试验阴性。根据其染色形态,该 2 株菌初步鉴定为快速生长的分枝杆菌。



注:左侧的光滑型菌落为 B0793;右侧的粗糙型菌落为 V1948。

图 1 菌株 B0793 与 V1948 血平板上培养 4d 的菌落形态图

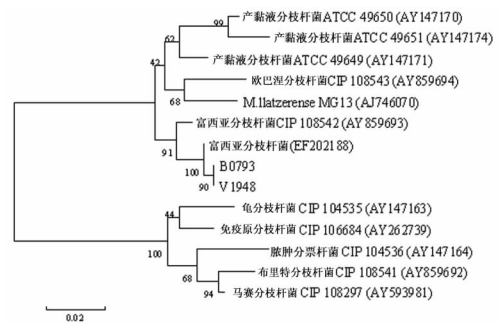


图 2 B0793、V1948 与分枝杆菌属相关菌株的 *ropB* 基因系统发生树

2.3 基因测序鉴定及结果分析 分离株 B0793、V1948 均扩增得到 16S rRNA 基因的全序列,大小约 1 500 bp。PCR 产物送与上海英韦创津广州公司进行测序,由获得的毛细管电泳峰谱来看,其基因序列的荧光峰图正常,无杂带、无背景信号干扰。以 DNA MAN 软件对基因序列的同源性进行比对,B0793 与 V1948 的相似为 100%。经序列拼接,得到 1 376 bp 有效序列,经 Blast(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)的 ref_rRNA 库进行分析,与富西亚分枝杆菌(*Mycobacterium phocaicum*)和产黏液分枝杆菌(*Mycobacterium mucogenicum*)均存在 5 个碱基的差异(相似度为 99.7%),与欧巴涅分枝杆菌(*Mycobacterium aubagnense*)存在 11 个碱基的差异(相似度为 99.2%),此外再无相似率高于 99.0% 的菌种。根据 CLSI MM18 的解释标准,B0793 与 V1948 可鉴定为:分枝杆菌属,是与富西亚分枝杆菌、产黏液分枝杆菌与欧巴涅分枝杆菌亲缘关系最接近的菌种。参考 Adékambi 等^[7]描述的方法,进一步扩增该 2 株的 *rpoB* 基因,测序得到约 675 bp 的目的序列。以 DNA MAN 软件对基因序列的同源性比对,其相似度亦为 100%,故 B0793 与

V1948 为同一克隆系,可认为该患者的血液感染是典型的导管相关感染。将获得的基因序列进行 Blast 分析,其与富西亚分枝杆菌模式菌株 CIP 108542 存在 12 个碱基的差异(相似度为 98.2%),与 Pagnier 等^[8]从冷却塔水中分离的富西亚分枝杆菌非模式菌株 T9(EU770581)、T31(EU770582)仅存在 4 个碱基的差异(相似度为 99.4%),而与产黏液分枝杆菌标准菌株 ATCC 49649 则存在 22 个碱基的差异(相似度为 96.7%),其与相关菌株的系统发育树见图 2。

2.4 药敏试验结果 B0793 与 V1948 的药敏试验结果见表 1。

表 1 B0793 与 V1948 的药敏试验结果

抗菌药物	B0793		V1948	
	MIC 值	敏感性	MIC 值	敏感性
阿米卡星	1.000	S	2.000	S
头孢西丁	1.000	S	1.000	S
环丙沙星	2.000	I	4.000	R
克拉霉素	0.128	S	0.064	S
亚胺培南	0.500	S	0.500	S
利奈唑胺	1.000	S	64.000	R
磺胺甲恶唑	4.000	S	64.000	R
妥布霉素	2.000	S	8.000	I

3 讨 论

富西亚分枝杆菌是 Adékambi 等^[9]2006 年描述的细菌新种,其存在于医院相关的冷却水、治疗泉中。目前,关于富西亚分枝杆菌的临床较为少见。Cooksey 等^[10]认为,富西亚分枝杆菌可能被错误为产黏液分枝杆菌,因为其采用分枝菌酸成分分析方法,富西亚分枝杆菌无法与产黏液分枝杆菌进行区分。本实验的 B0793 与 V1948,其表型形态上符合快生长分枝杆菌的特征,且 16S rRNA 基因和 *rpoB* 基因与富西亚分枝杆菌的相似度在 99%以上,可确认为富西亚分枝杆菌。这是国内首次发现富西亚分枝杆菌的临床感染报道,并且富西亚分枝杆菌的光滑型/粗糙型菌落变异为国际上首次发现。分枝杆菌的光滑型/粗糙型菌落变异,将直接影响细菌的毒力及耐药性。Catherinot 等^[11]发现,粗糙型菌落变异的脓肿分枝杆菌其毒力、侵袭力均明显高于光滑型菌落的分枝杆菌。Byrd 与 Lyons^[12]还发现,临床分离的野生型(粗糙型)脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)以人工减毒的方法,可转变成光滑型脓肿分枝杆菌。而通过细胞壁成分——糖脂质(glycopeptidolipids)的减少表达,可以实现脓肿分枝杆菌从光滑型细菌到粗糙型细菌的反转,并重新获得侵袭性毒力^[13]。在本研究中,患者长期静脉插管而引起了导管性相关的富西亚分枝杆菌侵袭性感染,其为粗糙型菌落,但侵入血流后引起患者的反复低热、寒战,并且在营养丰富的血液中多次繁殖、退化为成光滑型细菌。从药敏试验的结果来看,从静脉插管中分离的粗糙型菌株 V1948 对于阿米卡星、环丙沙星、妥布霉素、利奈唑胺、磺胺甲恶唑的最低抑菌浓度明显高于其血液中分离的光滑型菌株 B0793,其中的一些抗菌药物,如利奈唑胺与磺胺甲恶唑,对 B0793 表现为敏感但对 V1948 却表现为耐药。这可能与其细菌的细胞壁结构有关,光滑型细菌糖脂质丰富,亲水性强,容易为抗菌药物所作用;粗糙型菌落则刚好相反,其细胞壁富含脂溶性的索状因子,亲水性差,不容易为抗菌药物所作用。因此,对于导管性相关的分枝杆菌血流感染,拔除导管再进行抗感染治疗,可能是最好的治疗方法。

参考文献

[1] Ventura M, Canchaya C, Tauch A, et al. Genomics of acti-

nobacteria; tracing the evolutionary history of an ancient phylum[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2007, 71(3): 495-548.

[2] Miguez-Burbano MJ, Shor-Posner G, Hadrigan S. Non-tuberculous mycobacteria in HIV-infected patients: geographic, behavioural, and immunological[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(7): 394-395.

[3] Leao SC, Tortoli E, Viana-Niero C, et al. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed [J]. J Clin Microbiol, 2009, 479(9): 2691-2698.

[4] Lamy B, Marchandin H, Hamitouche K, et al. *Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(Pt 2): 486-490.

[5] Murray P, Patrick R, Baron EJ, 等. 临床微生物学手册 [M]. 徐建国, 梁国栋, 邢来君, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 1110.

[6] 屈平华, 赵红波, 黄彬, 等. 卫生部微生物室间质 1012 菌的鉴定与放线菌属的系统发生分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9): 814-819.

[7] Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5699-5708.

[8] Pagnier I, Merchat M, Raoult D, et al. Emerging Mycobacteria spp. in cooling towers[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(1): 121-122.

[9] Adékambi T, Berger P, Raoult D, et al. *RpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(Pt 1): 133-143.

[10] Cooksey RC, Jhung MA, Yakrus MA, et al. Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium phocaicum* associated with an outbreak of bacteremias at a Texas hospital[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(8): 2480-2487.

[11] Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, et al. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain[J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 1055-1058.

[12] Byrd TF, Lyons CR. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4700-4707.

[13] Howard ST, Rhoades E, Recht J, et al. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype[J]. Microbiology, 2006, 152(Pt 6): 1581-1590.