

• 综 述 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 18. 040

诺卡菌分子鉴定方法的研究进展*

黄 磊 综述,张 艺 审校

(北京大学第一医院检验科,北京 100034)

关键词:诺卡菌; 基因测序; 质谱; 鉴定

中图分类号:R446. 5 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2018)18-2814-04

诺卡菌是一群需氧革兰阳性分枝杆菌,可存在于土壤、空气、水、动植物排泄物中,主要通过吸入或破损皮肤侵入人体引起感染,可引起局部或全身感染,好发于免疫功能低下患者(例如器官移植后,使用糖皮质激素,HIV 感染等免疫抑制状态),也可见于健康人^[1-2]。近年来国际上和我国有关诺卡菌感染的报道不断增多,日益受到关注^[3-6]。

诺卡菌感染在临床及影像学上缺乏特异性,其诊断往往依靠实验室检测,涂片镜检的灵敏度低且不能鉴定到种,培养出可疑菌落后用生化方法仅有少数几种诺卡菌能鉴定到种^[7]。诺卡菌有 50 多个种,其中脓肿诺卡菌、皮疽诺卡菌、巴西诺卡菌、新诺卡菌、豚鼠耳炎诺卡菌等 13 个菌种可引起人类感染,且不同菌种对抗菌药物的敏感性不同,所以对早期诊断和治疗,鉴定到种非常重要。

目前只有分子生物学方法能将诺卡菌准确鉴定到种,从早期的 PCR 扩增目的片段后电泳检测、PCR-限制性核酸内切酶分析、反向点杂交、焦磷酸测序等,发展到目前广泛应用的基因测序(16S rRNA、hsp65、recA1、gyrB 和 rpoB)、多位点序列分析(MLSA)和质谱(MALDI-TOF MS)技术^[7]。以上方法各有优势和局限性,本文对目前广泛应用的 3 类方法作一综述。

1 基因测序

1.1 16S rRNA 基因 细菌 16S rRNA 序列内同时存在高度保守和高度变异的区域,是一个稳定的遗传标记,可将细菌鉴定到种水平,获得不依赖表型特征的客观结果,是最早和最广泛用于诺卡菌鉴定的基因^[1,8]。但是在诺卡菌中的某些种,该基因存在多拷贝现象,不同拷贝显示为不同的碱基序列,在测序峰图上显示为多个重叠峰。目前已知存在多拷贝基因的模式菌株包括凹陷诺卡菌、未知诺卡菌、山梨诺卡菌、新诺卡菌等,NCBI 数据库中这些菌株的 16S rRNA 基因序列存在相当比例的错误^[9-10]。此外 16S rRNA 序列也无法区分亲缘关系非常接近的诺卡菌,例如新诺卡菌复合体^[11]。

XIAO 等^[12]针对诺卡菌 16S rRNA 基因 5'端 606 bp 区域进行测序,以一致性≥99%作为判断标准,鉴

定 25 株常见诺卡菌的准确率为 96%,其中包括 12 株圣乔治诺卡菌、9 株皮疽诺卡菌、2 株脓肿诺卡菌和 1 株豚鼠耳炎诺卡菌,但是未鉴定出一些少见的种,比如华莱士诺卡菌。因此单独使用 16S rRNA 测序来鉴定诺卡菌有一定的局限性。

1.2 hsp65 基因 hsp65 基因编码是相对分子质量为 6.5×10⁴ 的热休克蛋白,也可用于鉴定诺卡菌,既往研究多为比较其与 16S rRNA 基因测序对诺卡菌的鉴定能力。RODRÍGUEZ-NAVA 等^[13]评估了 hsp65 基因特定的 441 bp 区域对不同种诺卡菌的鉴定能力,发现该基因比 16S rRNA 拥有更多可变区,诺卡菌种间差异更显著,这种差异可用于区分某些 16S rRNA 序列非常相似甚至是 100%一致的菌株,例如可以区分 16S rRNA 序列非常相似的塞拉多诺卡菌和老兵诺卡菌。

RUDRAMURTHY 等^[14]对来自印度的 25 株临床分离的诺卡菌同时用 16S rRNA 和 hsp65 测序,发现这两个基因均可鉴定 90%的常见诺卡菌,例如皮疽诺卡菌、圣乔治诺卡菌等,同时也存在少量不一致的情况。由于 GenBank 中的北京诺卡菌、关节炎诺卡菌、亚洲诺卡菌的 hsp65 序列的信息很少,故使用 hsp65 序列比对不能很好地区分上述 3 种诺卡菌,而 16S rRNA 的长片段(1 000 bp 以上)测序则可以。此外还发现 hsp65 基因在圣乔治诺卡菌中存在异质性,可用于该菌的进一步分子分型。

1.3 secA1 基因 secA1 基因编码分泌蛋白 A1,蛋白 A1 对于蛋白质通过细胞膜的输出非常重要。secA1 基因特定的 468 bp 区域可用于诺卡菌鉴定。KONG 等^[15]在对 120 株诺卡菌临床分离株的研究中,发现用 secA1 基因的鉴定结果与 16S rRNA 的 5'末端 606bp 序列的鉴定结果存在某些不一致,例如 16S rRNA 鉴定为新诺卡菌、脓肿诺卡菌、苛养诺卡菌和德兰士瓦诺卡菌的菌株,secA1 基因则对相应菌株分别鉴定为诺卡菌某些种、亚洲诺卡菌、非洲诺卡菌、布氏诺卡菌。此外 secA1 比 16S rRNA 序列具有更多的序列多样性,尤其是新诺卡菌有 14 个序列型、皮疽诺卡菌和老兵诺卡菌各有 7 个序列型。因此 secA1

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201338)。

是 16S rRNA 鉴定的补充,并且可用于诺卡菌种系发育和亚型研究。此外 secA1 还可用于鉴定某些极少见诺卡菌,例如曾经在 1 例器官移植后患肺诺卡菌病的患者中用 secA1 测序方法鉴定出泰国诺卡菌,并与 16S rRNA 测序进行了比较,一致性很高,这是在全球范围内第 3 次报道该种诺卡菌^[16]。

1.4 gyrB 基因 gyrB 基因编码 DNA 旋转酶的 β 亚基,虽然某些菌种存在多重拷贝,但 gyrB 基因也可用于诺卡菌的菌种鉴定。TAKEDA 等^[17]对 56 株诺卡菌模式菌株的评估结果表明,gyrB 基因 1 200 bp 范围内的种间差异度 82.4%~99.9% (2~270 个碱基差异),是 16S rRNA 的种间差异的 3.6 倍。这表明 gyrB 比 16S rRNA 在诺卡菌鉴定中具有更高分辨率。CARROSCO 等^[18]的研究表明,gyrB 可用于临床常见诺卡菌鉴定、分型和亲缘关系比较,这包括脓肿诺卡菌、圣乔治诺卡菌、皮疽诺卡菌、新诺卡菌。CARROSCO 等^[19]的进一步研究表明,16S rRNA 结合 gyrB 可提高常见诺卡菌的鉴定能力,这包括巴西诺卡菌、豚鼠耳炎诺卡菌,以及不常见诺卡菌,包括熊本诺卡菌、未知诺卡菌、寡食诺卡菌、肺炎诺卡菌、脓液诺卡菌、武田诺卡菌、老兵诺卡菌、酒红诺卡菌,但是未鉴定出其他 12 种诺卡菌。gyrB 基因对于肉诺卡菌、德兰士瓦诺卡菌、巴西诺卡菌和豚鼠耳炎诺卡菌的鉴定率较高。

1.5 rpoB 基因 rpoB 基因编码 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚基,也可用于诺卡菌鉴定,但目前单独评价该基因的文献报道较少,已有报道多为将 rpoB 的测序结果作为多点序列分析(MLSA)的一部分。CARROSCO 等^[18]研究表明,rpoB 基因在脓肿诺卡菌、圣乔治诺卡菌、皮疽诺卡菌和新诺卡菌复合体,比 16S rRNA 具有更高的基因多态性,而 16S rRNA 用于鉴定脓肿诺卡菌和新诺卡菌复合体时效果不好,因此 rpoB 是 16S rRNA 测序的有益补充。

2 多位点序列分析(MLSA)

由于使用单个基因测序存在不足,MCTAG-GART 等^[20]最早对 190 株临床分离的诺卡菌和 36 株模式菌株,采用 MLSA 方法,同时测序 16S rRNA、gyrB、secA1、hsp65、rpoB 基因,然后把 5 个基因的测序结果串联在一起,创建基于序列的种系发生簇,结果显示 71.3% 的临床株可与模式株聚类在一起,从而鉴定到种水平,也可以鉴定出之前未曾报道过的新种。并且发现 3 个基因位点组合(gyrB-16S-secA1)和 4 个基因位点组合(gyrB-16S-secA1-hsp65)与 5 个基因位点组合具有相当的鉴定能力,鉴定一致率分别为 98.5% 和 95.5%。并且研究中发现,单独使用 hsp65 和 rpoB 时,得到的鉴定结果与 MLSA 的结果存在显著差异,这可能是因为 MLSA 检测多个基因时削弱了单个基因序列中有差异的等位基因的影响。

CARRASCO 等^[8]用 4 个位点 MLSA 鉴定了 67

株经 16S rRNA 测序和质谱方法鉴定不一致的诺卡菌,结果表明 MLSA 在少见诺卡菌种,如塞拉多诺卡菌、未知诺卡菌、肺炎诺卡菌的鉴定能力很好,而不能区分经 16S rRNA 鉴定为华莱士诺卡菌和布氏诺卡菌(质谱方法仅对这两种诺卡菌给出了不可靠的鉴定结果),MLSA 也不能区分短链诺卡菌/寡食诺卡菌、关节炎诺卡菌/微白诺卡菌、克鲁克诺卡菌/青叶町诺卡菌、非洲诺卡菌/新诺卡。

XIAO 等^[12]用五位点 MLSA (16S rRNA-gyrB-secA1-hsp65-rpoB)和 16S rRNA 测序同时鉴定 25 株诺卡菌临床分离株,其中 24 株的鉴定结果一致,且 MLSA 能够准确鉴定华莱士诺卡菌,而 16S rRNA 测序不能,并且 MLSA 将圣乔治诺卡菌进一步分为 3 个亚群。因此 MLSA 比 16S rRNA 具有更高的分辨率。

3 基质辅助激光解吸电离-时间飞行质谱(MALDI-TOF MS)技术

MALDI-TOF MS 技术根据不同微生物蛋白质的核质比差异,将单个菌株的质谱图谱与数据库中的质谱图谱进行比较,从而得到鉴定结果,近年来由于其通量增加和潜在的优势,已逐渐用于诺卡菌鉴定^[21]。

BLOSSER 等^[22]的多中心研究评价了使用经 FDA 和 CFDA 认可的商品化布鲁克 MALDI-TOF MS 质谱仪对 150 株诺卡菌的鉴定结果,他们使用了标准化的培养、蛋白提取和质谱鉴定方法。结果表明,86% 菌株准确鉴定到种/种复合群水平,6% 菌株未出鉴定结果,4% 通过现有数据库(布鲁克的参考数据库、美国国立卫生院的诺卡菌补充数据库、俄亥俄州立大学的诺卡菌补充数据库)鉴定为少见种,对这些鉴定不理想的菌株重新提取蛋白检测,并使用自建数据库比对,使鉴定结果在种水平和属水平的一致性分别提高了 18.2% 和 36.9%。

BUCKWALTER 等^[23]使用布鲁克 MALDI-TOF MS 质谱仪评估了质谱方法和 16S rRNA 测序在 148 株诺卡菌鉴定中的一致性,发现当使用厂家提供的商品化数据库(布鲁克的参考数据库、布鲁克的分枝杆菌特异性数据库)时正确率仅 42%,当使用客户实验室自建数据库时正确率可达 90%,说明厂家提供的商品化数据库存在一定的局限性,主要因为该库中的诺卡菌图谱多为模式菌株,而缺少足够数量的临床菌株图谱,尤其是少见诺卡菌。

CARRASCO 等^[8]使用布鲁克 MALDI-TOF MS 质谱仪和布鲁克的参考数据库分析了西班牙地区高分离率(25 株)、中分离率(20 株)和低分离率(55 株)的诺卡菌,结果表明 MALDI-TOF 对高分离率菌株的鉴定一致率与 16S rRNA 测序相当(达 76%),对中分离率和低分离率菌株则存在较大差异,一致率分别为 45% 和 27%。

XIAO 等^[12]的研究表明,使用布鲁克 MALDI-TOF MS 质谱仪检测 25 株诺卡菌临床分离株,当使

用布鲁克的参考数据库时,上述菌株均未鉴定成功;当使用已知鉴定结果的 5 株菌的图谱进行实验室自建数据库时,上述菌株有 95% 可准确鉴定到种水平(≥ 2.0 分)。此外用 MALDI-TOF 不能准确鉴定出亲缘关系很近的种,如新诺卡菌复合体成员。

GIRARD 等^[24]使用经 FDA 和 CFDA 认可的商品化威泰科(VITEK) MALDI-TOF MS 质谱仪检测 164 株诺卡菌临床分离株,他们优化了样本制备流程,并使用即将面世的 VITEK MS IVD 数据库(3.0 版)。其结果与 16S rDNA 测序进行比对,一致率为 94%,仅有少量不常见的诺卡菌鉴定错误。该结果与使用布鲁克质谱仪及其相应数据库得到的结果相比,显示出很大的优越性^[8,12,22-23]。

综上所述,MALDI-TOF 用于诺卡菌鉴定最主要的局限性是现有商品化数据库中缺乏相应的图谱,某些诺卡菌模式菌株的质谱图谱与临床株不同,因此当遇到不常见诺卡菌时,需要用已鉴定好的临床菌株建立和完善原有数据库。当遇到某个种可能含有质谱图虽不同,但又关联的菌株时,比较同一种诺卡菌的所有质谱图可提高鉴定准确率。因此对诺卡菌的鉴定来说,仍需进一步丰富现有的商品化数据库,尤其是不常见诺卡菌的数据库。

4 小 结

目前,仅有分子生物学方法可将诺卡菌准确鉴定到种,其中应用较广泛的方法包括基因测序(16S rRNA、hsp65、secA1、gyrB 和 rpoB)、MLSA 和 MALDI-TOF MS 技术。在基因测序方法中,16S rRNA 基因是应用最早、最广泛的目的片段,对于常见诺卡菌具有较好的鉴定准确度,但在某些少见诺卡菌中因存在基因多拷贝现象,而无法准确鉴定。hsp65、recA1、gyrB、rpoB 与 16S rRNA 相比,在不同种诺卡菌中具有更高的基因序列多态性,在鉴定少见诺卡菌和亲缘关系非常接近的诺卡菌时,是 16S rRNA 的有益补充。MLSA 是将上述基因中的 3~5 个分别测序后串联在一起构建种系发生簇,根据种系间的亲缘关系来鉴定菌株,比单个基因测序具有更高分辨率。质谱技术简便、快速、成本低,可高通量检测,但现有的商品化数据库中缺乏足够的临床菌株图谱,直接使用效果较差,实验室依据临床菌株自建数据库后,鉴定准确度可显著提高。

参考文献

- [1] BROWN-ELLIOTT B A, BROWN J M, CONVILLE P S, et al. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 259-282.
- [2] 张淑香, 钱玉婷. 诺卡菌感染 9 例临床分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(4): 356-360.
- [3] YANG M F, XU M, WEI W, et al. Clinical findings of 40

- patients with nocardiosis: a retrospective analysis in a tertiary hospital[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1): 25-30.
- [4] WEI M, WANG P, QU J X, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 11(12): 183-187.
 - [5] 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.
 - [6] WANG H K, SHENG W H, HUNG C C, et al. Clinical characteristics, microbiology, and outcomes for patients with lung and disseminated nocardiosis in a tertiary hospital[J]. J Formos Med Assoc, 2013, 114(8): 742-749.
 - [7] 王辉. 临床微生物学手册[M]. 北京: 中华电子音像出版社, 2017: 652-655.
 - [8] CARRASCO G, DE DIOS CABALLERO J, 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(4): 542.
 - [9] CONVILLE P S, WITEBSKY F G. 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.
 - [10] CONVILLE P S, WITEBSKY F G. Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6): 2881-2885.
 - [11] XIAO M, KONG F R, SORRELL T C, et al. Identification of pathogenic *Nocardia* species by reverse line blot hybridization targeting the 16S rRNA and 16S-23S rRNA gene spacer regions[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 503-511.
 - [12] XIAO M, PANG L, CHEN S C, et al. Accurate identification of common pathogenic *nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147487.
 - [13] RODRÍGUEZ-NAVA 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.
 - [14] RUDRAMURTHY S M, HONNAVAR P, KAUR H, et al. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(10): 1216-1225.
 - [15] KONG F R, WANG H P, ZHANG E Q, et al. SecA1 gene sequence polymorphisms for species identification of *nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 3928-3934.
 - [16] CANTERINO J, PANIZ-MONDOLFI A, BROWN-EL-

- LIOTT B A, et al. Nocardia thailandica Pulmonary Nocardiosis in a Post-Solid Organ Transplant Patient[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11):3686-3690.
- [17] TAKEDA K, KANG Y Q, YAZAWA K, et al. Phylogenetic studies of Nocardia species based on gyrB gene analyses[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 2):165-171.
- [18] CARRASCO G, VALDEZATE S, GARRIDO N, et al. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical nocardia species in Spain according to their gyrB and rpoB genes[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11):3602-3608.
- [19] CARRASCO G, VALDEZATE S, GARRIDO N, et al. GyrB analysis as a tool for identifying nocardia species and exploring their phylogeny[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(3):997-1001.
- [20] MCTAGGART L R, RICHARDSON S E, WITKOWSKA M, et al. Phylogeny and identification of Nocardia species on the basis of multilocus sequence analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12):4525-4533.
- [21] SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA P K, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. Front Microbiol, 2015, 6(8):791.
- [22] BLOSSER S J, DRAKE S K, ANDRASKO J L, et al. Multicenter Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry study for identification of clinically relevant nocardia spp[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(5):1251-1258.
- [23] BUCKWALTER S P, OLSON S L, CONNELLY B J, et al. Evaluation of Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry for identification of mycobacterium species, nocardia species, and other aerobic actinomycetes[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2):376-384.
- [24] GIRARD V, MAILLER S, POLSINELLI S, et al. Routine identification of Nocardia species by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 87(1):7-10.

(收稿日期:2018-01-16 修回日期:2018-03-27)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.041

血清高尿酸在心血管疾病中应用的研究进展

唐红霞 综述, 贾克刚[△] 审校

(泰达国际心血管病医院检验科, 天津 300457)

关键词: 尿酸; 心血管疾病; 高尿酸血症; 危险因素

中图法分类号: R543

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)18-2817-05

心血管疾病(CVD)是全球病死的主要病因之一^[1]。我国 CVD 在城乡居民的病死原因中居首位。最新调查报告显示,农村居民和城市居民的 CVD 病死率分别为 295.63/100 000 和 261.99/100 000^[2]。尿酸(UA)被认为是一种代谢指标,近年来大量关于高尿酸血症(HUA)与 CVD 的分析,尤其是干预性和前瞻性的临床研究发现,HUA 是 CVD 的一个重要危险因素。尽管 HUA 对 CVD 的危险性影响是否具有独立性的问题仍存在争议,但两者之间的相关性已被国内外众多研究证实^[3-4]。UA 的检测方法准确快捷,同时是实验室常规生化的检测项目,如果能被早期发现并利用其在 CVD 治疗和预后中的作用,可减少 CVD 对健康的威胁,将具有重要的临床意义。现通过对最近几年内公布的研究成果进行分析,就血清 UA 水平和 CVD 之间的关系作一综述。

1 UA 的生理代谢

UA 是细胞嘌呤代谢的终产物。细胞内核酸和其他嘌呤类化合物,经代谢分解生成的嘌呤及食物中的嘌呤,经一系列酶的作用,生成黄嘌呤和次黄嘌呤,再经黄嘌呤氧化酶催化生成 UA。机体 UA 来自内源性

合成和食物,分别占 80% 和 20%,随尿液和粪便排出体外,分别占 2/3 和 1/3。健康者 UA 水平处于动态平衡状态,无论是生成过多或清除过低都可引起 UA 水平增高,导致 HUA。UA 在血中溶解度不高,当浓度高于其最大溶解饱和度 416 $\mu\text{mol/L}$ 时,易从血液中析出结晶,形成沉淀。HUA 是指正常嘌呤饮食状态下,非同日 2 次空腹 UA 水平男性 $>420 \mu\text{mol/L}$ 、女性 $>357 \mu\text{mol/L}$ 。由 UA 排泄不良引起的 HUA 约占 90%,与各种原因导致的肾小球滤过降低、肾小管排泌降低、肾小管重吸收增加、尿酸盐的析出结晶物在泌尿系统中沉淀有关;由于 UA 生成过多引起的 HUA 约占 10%,与 UA 生成过程中多种重要酶的功能异常有关,富嘌呤食物的摄入过量可能使 UA 生成增多,然而其影响较弱。

2 血清 UA 与 CVD 的关系

一般而言,较高的 UA 水平多见于男性,以及年龄较大、血压较高、胆固醇水平增加、身体质量指数更高的人群,这些因素也正是 CVD 的危险因素。AN-DO 等^[5]研究显示 UA 水平较高者具有较高的血管炎性趋势,但并未显示 UA 水平升高会增加钙化的趋

[△] 通信作者: E-mail: txjia@126.com。