

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.04.002

· 论 著 ·

基于细菌 16S rRNA 基因扩增临床不常见病原菌的价值

曹敬荣¹, 高世超¹, 陈典典¹, 陈静^{1,2}, 闵嵘¹, 王培昌¹

(1 首都医科大学宣武医院, 北京 100053; 2 江西卫生职业学院, 江西 南昌 330201)

[摘要] **目的** 探讨 16S rRNA 基因扩增与测序在临床不常见病原菌鉴定中的价值, 指导临床相关感染的诊治。**方法** 选择临床微生物实验室常规方法难以准确鉴定、无法鉴定或有特殊表型的细菌 12 株, 采用聚合酶链反应(PCR)扩增其 16S rRNA 基因, 测序后进行 BLAST 比对鉴定菌种, 并分析相关感染的临床特点。**结果** 12 株细菌经 PCR 扩增均得到阳性条带(约 1 500 bp), 均鉴定到种(相似度 $\geq 99\%$), 分别为产单核细胞李斯特菌、马耳他布鲁杆菌各 2 株, 死亡梭杆菌、空间罗氏菌、鼻疽奴卡菌、解糖葡萄球菌、放射性根瘤菌、二路普雷沃菌、解甘露醇罗尔斯顿菌及阴道阿托波菌各 1 株。16S rRNA 基因扩增灵敏度高, 大肠埃希菌 ATCC 25922 的最低检测限为 1.5×10^1 CFU/mL。12 例患者临床资料显示上述菌可引起临床多部位、多类型感染, 选用针对性抗菌药物治疗后 11 例好转, 1 例死亡。**结论** 16S rRNA 基因测序方法可快速、准确鉴定少见菌、厌氧菌及难培养细菌, 为临床不同类型感染的病原学诊断和治疗提供实验室依据。

[关键词] 16S rRNA; 病原菌; 鉴定; 感染; 分子生物学方法; 聚合酶链反应

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)04-0222-05

Value of 16S rRNA gene amplification for identification of clinical rare pathogens

CAO Jing-rong¹, GAO Shi-chao¹, CHEN Dian-dian¹, CHEN Jing^{1,2}, MIN Rong¹, WANG Pei-chang¹ (1 Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China; 2 Jiangxi Health Vocational College, Nanchang 330201, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the value of amplification and sequencing of 16S rRNA gene in the identification of clinical rare pathogenic bacteria, and guide the diagnosis and treatment for related clinical infection. **Methods** 12 bacterial isolates that were difficult, or unable to be identified with conventional laboratory methods, or with special phenotypes were collected. The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), then sequenced for identifying bacterial species through BLAST comparison, clinical characteristics of related infection were analyzed. **Results** 12 clinical isolates were all positive for PCR amplification (about 1 500 bp), species were all identified (similarity $\geq 99\%$), the identified strains were *Listeria monocytogenes* ($n=2$), *Brucella melitensis* ($n=2$), *Fusobacterium mortiferum* ($n=1$), *Rothia aeria* ($n=1$), *Nocardia farcinica* ($n=1$), *Staphylococcus saccharolyticus* ($n=1$), *Rhizobium radiobacter* ($n=1$), *Prevotella bivia* ($n=1$), *Ralstonia mannitolilytica* ($n=1$), and *Atopobium vaginae* ($n=1$). The sensitivity of 16S rRNA gene amplification was high, and the minimum detection limit of *Escherichia coli* ATCC 25922 was 1.5×10^1 CFU/mL. Clinical data of 12 patients revealed that these strains can cause multi-sites and multi-types of infection, after patients received targeted antimicrobial therapy, 11 improved, and 1 died. **Conclusion** Sequencing for 16S rRNA gene can rapidly and accurately identify rare, anaerobic, and difficult cultured bacteria, provide laboratory evidence for etiological diagnosis and treatment of different types of infection.

[Key words] 16S rRNA; pathogen; identification; infection; molecular biological method; polymerase chain reaction

[Chin J Infect Control, 2016, 15(4): 222-226]

[收稿日期] 2015-08-22

[基金项目] 首都临床特色应用研究重点专项课题(Z141107002514012)

[作者简介] 曹敬荣(1979-), 女(汉族), 河北省邢台市人, 主治医师, 主要从事临床微生物检验、细菌耐药性及分子流行病学研究。

[通信作者] 王培昌 E-mail: pcw1905@126.com

病原学检测对感染性疾病的诊疗十分重要,目前,大部分临床微生物实验室采用商品化的鉴定系统鉴定病原菌,但对于临床少见、疑难或表型相近的细菌,该方法会出现偏差,不能满足临床快速、准确鉴定病原菌的需求^[1]。随着分子生物学方法成本逐渐降低、基因数据库不断更新,基于细菌 16S rRNA 基因的测序技术在微生物界已成为热点^[2-5],并逐渐成为细菌菌种鉴定和分类的金标准^[6-8]。本研究选择实验室常规方法难以准确鉴定、无法鉴定或有特殊表型的细菌,应用聚合酶链反应(PCR)扩增其 16S rRNA 基因并测序,探讨该方法在临床不常见病原菌鉴定中的价值。

1 材料与方 法

1.1 研究资料 选择临床微生物实验室常规方法难以准确鉴定、无法鉴定或有特殊表型的细菌 12 株。阳性质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、粪肠球菌 ATCC 29212 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853,阴性对照为白假丝酵母菌 ATCC 10231 和双蒸水。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂为 Pathogen Lysis Tubes (L) 和 QIAamp® UCP Pathogen Mini Kit (QIAGEN, Germany)、Premix Taq 和 DL2000 DNA Marker (TaKaRa, Japan)、细菌和酵母菌 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)。主要仪器为涡旋振荡器(Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA)、PCR 仪(Veriti 9902, Applied Biosystems, USA)、电泳仪(北京六一仪器厂,中国)、凝胶成像仪(U-Genius, Gene Company, UK)、离心机(Eppendorf AG22331, Hamburg, Germany)、生物安全柜(Thermo scientific,China)、全自动微生物鉴定仪(Vitek 2 Compact, bioMerieux, France)、全自动血培养仪(BD BACTEC9120, USA)。

1.3 培养及鉴定 需氧菌、兼性厌氧菌采用血平板、中国蓝平板,置于 5%~10%CO₂ 环境中进行培养,厌氧菌采用厌氧平板培养;脑脊液、血、关节液等培养采用 BD 公司 BACTECTM 9240 全自动血培养系统,仪器报阳性后根据检验目的及镜检结果转种血平板、中国蓝及巧克力琼脂平板,35℃培养 24~48 h。

细菌鉴定时根据可疑菌落的革兰染色结果选择合适的鉴定卡,利用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统鉴定。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增

1.4.1 DNA 提取 实验菌株和标准菌株 DNA 的提取按 DNA 提取试剂盒说明书进行,获得的 DNA 模板 -20℃保存。

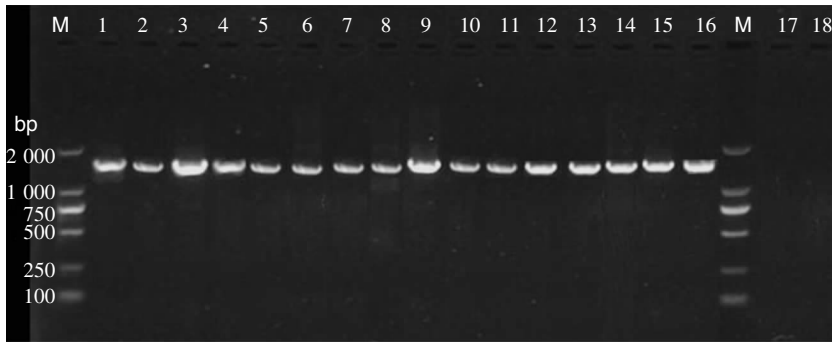
1.4.2 PCR 扩增 根据文献^[3]合成细菌通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'),目的片段约 1 500 bp,引物合成和测序委托英潍捷基(上海)贸易有限公司。反应体系 25 μL: Premix EX Taq 12.5 μL, Primer 上下游各 1 μL (10 μmol/L), DNA 模板 5 μL, 双蒸水补足至 25 μL。PCR 扩增参数为 94℃预变性 3 min, 94℃变性 45 s, 60℃退火 45 s, 72℃延伸 1.2 min(35 个循环),最终 72℃延伸 7 min。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳,在紫外凝胶成像系统分析仪中进行观察。

1.4.3 序列分析 PCR 产物测序序列提交至 Genbank 数据库,挑选最佳 BLASTN 序列比对结果确定细菌种属。基因序列的同源性比对与结果解释参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)MM18-A 的判定规则^[9]:相似度≥99%判断为同种,相似度在 95%~99%判断为同属,相似度 91%~95%则判断为同科。

1.4.4 最低检出限检测 大肠埃希菌 ATCC 25922 培养后制备浓度为 0.5 麦氏单位的菌液,采用 10 倍连续稀释法,使菌悬液浓度为 1.5×10⁸~1.5×10¹CFU/mL,提取不同浓度菌液 DNA 并进行 PCR 扩增,测试 PCR 扩增阳性所需最低样本含菌量。

2 结果

2.1 16S rRNA 通用引物 PCR 扩增结果 12 株临床分离少见菌和 4 株标准菌株(ATCC 25922、ATCC 25923、ATCC 27853 和 ATCC 29212)经 PCR 扩增,均获得与目的片段大小一致的基因片段(1 500 bp 左右),白假丝酵母菌和双蒸水 PCR 扩增结果均为阴性。见图 1。



M 为 DNA Marker(DL2000);1—12 分别为临床分离菌株扩增结果;13—16 为 4 株标准菌株扩增结果;17 为白假丝酵母菌扩增结果(阴性);18:阴性对照

图 1 16S rRNA 通用引物 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR amplification results of 16S rRNA by universal primer

2.2 16S rRNA 基因测序结果 4 株标准菌株的序列结果在 GenBank 中比对完全符合(100%);临床标本分离的病原菌均鉴定到种水平(相似度≥99%)。

病原菌 16S rRNA 基因序列分析结果与临床感染特征见表 1。

表 1 12 株临床不常见病原菌株的来源、鉴定与临床感染特征

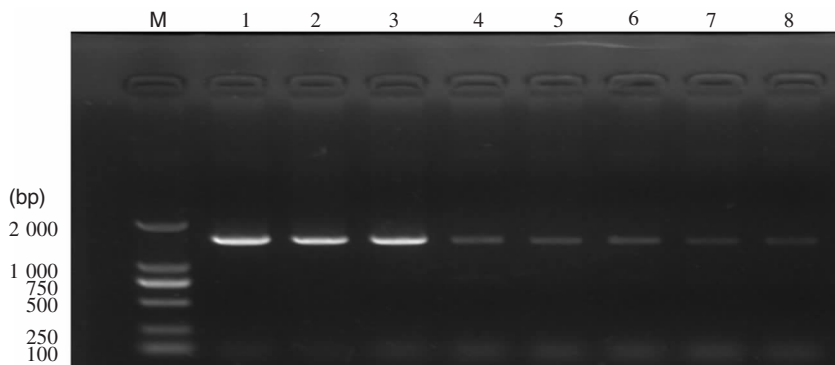
Table 1 Sources, identification, and clinical infectious characteristics of 12 isolates of clinical rare pathogens

编号	性别	年龄(岁)	临床诊断	感染类型	标本	培养条件	VITEK 2 Compact 鉴定结果	16S rRNA 鉴定结果	抗菌药物 ^a	转归
1	男	56	高处坠落伤、多发伤、胸腔积液、腹腔感染	胸腔感染	胸腔积液	厌氧	死亡梭杆菌	死亡梭杆菌(99%)	亚胺培南、克林霉素	好转
2	女	32	宫内感染、胎死宫内	宫内感染	胎盘组织	需氧	产单核细胞李斯特菌	产单核细胞李斯特菌(99.9%)	青霉素	胎儿死亡
3	男	60	颅内感染、症状性癫痫、脑积水	中枢神经系统感染	脑脊液	需氧	马耳他布鲁杆菌	马耳他布鲁杆菌(99%)	利福平、多西环素	好转
4	男	38	感染性心内膜炎	血流感染	血	需氧	33%的麦氏放线菌、丙酸杆菌和小棒状杆菌	空间罗氏菌(99.9%)	氨苄西林/舒巴坦	好转
5	男	59	肺奴卡菌病、多发脑脓肿	呼吸道感染、颅内感染	痰	需氧	不能鉴定	鼻疽奴卡菌(99.9%)	复方磺胺甲噁唑、链霉素	好转
6	男	60	败血症、感染性休克、肺炎	血流感染	血	厌氧	解糖葡萄糖菌(55%)、木糖葡萄糖菌(50%)	解糖葡萄糖菌(99%)	万古霉素	死亡
7	男	59	神经型布鲁菌病	中枢神经系统感染	脑脊液	需氧	马耳他布鲁杆菌	马耳他布鲁杆菌(99%)	头孢曲松、利福平、多西环素	好转
8	男	101	败血症、消化道出血	血流感染	血	需氧	产单核细胞李斯特菌	产单核细胞李斯特菌(99.9%)	哌拉西林/他唑巴坦、替考拉宁	好转
9	男	57	颅内感染	中枢神经系统感染	脑脊液	需氧	放射性根瘤菌	放射性根瘤菌(99%) ^[10]	亚胺培南、依替米星	好转
10	女	28	血流感染、羊水污染	血流感染	血、羊水	厌氧	二路普雷沃菌	二路普雷沃菌(100%)	美洛西林/舒巴坦	好转
11	女	60	血流感染	血流感染	血	需氧	解甘露醇罗尔斯顿菌	解甘露醇罗尔斯顿菌(100%)	左氧氟沙星、头孢吡肟	好转
12	女	35	血流感染	血流感染	血	厌氧	阴道阿托波菌	阴道阿托波菌(100%)	克林霉素	好转

a: 为临床根据鉴定及药敏结果最终使用的药物

2.3 PCR 检测大肠埃希菌最低检测限 大肠埃希菌 ATCC 25922 的最低检测限为 1.5×10^1 CFU/mL,

双蒸水(阴性对照)基因扩增结果为阴性。见图 2。



M 为 DNA Marker(DL2000), 1—8 依次为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10^1 CFU/mL 菌液提取 DNA 的 PCR 扩增产物

图 2 不同浓度大肠埃希菌 PCR 扩增电泳图

Figure 2 PCR amplification results of *Escherichia coli* with different concentrations

2.4 临床感染特征分析 12 株少见细菌可引起呼吸道、皮肤软组织、胸腔、子宫内、中枢神经系统、血流等临床多部位、多类型感染,具有相应的临床表现和体征,临床结合病原菌鉴定结果及药敏结果选择针对性的抗菌药物治疗后,11 例好转,1 例死亡。

3 讨论

微生物鉴定及药敏结果是指导临床抗感染治疗的重要依据,准确、快速的病原学鉴定是协助临床正确诊治患者的前提,目前临床常规鉴定方法是根据细菌的菌落形态、革兰染色等进行的表型鉴定(如 VITEK 2 Compact 等商品化微生物鉴定系统),其受多种因素的影响,常出现不能准确鉴定细菌的情况,尤其对临床少见菌的鉴定率低^[1]。16S rRNA 存在于所有原核生物中,能鉴定包括罕见菌、苛养菌、厌氧菌等在内的所有细菌^[2-6]。蔡莹等^[4]通过对临床 84 株菌的 16S rRNA 基因测序发现,该方法可增加病原体检测的敏感性和特异性、扩大病原谱、缩短检测时间、减少抗菌药物对检测的抑制作用,相对于常规方法更准确。本组大肠埃希菌 ATCC 25922 的最低检测限为 1.5×10^1 CFU/mL,可微量检测病原菌。

本组 4 株标准菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物测序,结果与 GenBank 中相应菌株比对,符合率 100%,且对革兰阴性菌或革兰阳性菌均适用,说明 16SrRNA 序列分析可靠,可用于临床菌株的鉴定。12 株实验菌株经 16S rRNA 序列分析与比对,均鉴定到种水平(相似度 $\geq 99\%$),说明 16S rRNA 基因测序方法相较于常规方法鉴定谱更广、更准

确^[1-3]。4 号菌 VITEK 2 Compact 鉴定率低(33% 的麦氏放线菌、丙酸杆菌和小棒状杆菌),无法给出准确的鉴定结果,其原因是系统不包含空间罗氏菌数据、且该菌生长缓慢、表型特征易与奴卡菌属、放线菌属等混淆所致,但序列测定可准确鉴定;5 号菌生长缓慢、菌落不溶于生理盐水,常规方法很难鉴定,而 16S rRNA 序列分析可为临床确诊提供帮助,准确鉴定为鼻疽奴卡菌(99.9%);6 号菌与其他凝固酶阴性葡萄球菌表型特征相似,我国分离率极低,对其研究相对较少^[11],常规鉴定虽给出结果但鉴定率低,需 16S rRNA 等分子学方法进行确认(鉴定率 99%)。此外,本组研究还发现了本实验室首次鉴定的细菌,如鼻疽奴卡菌和放射性根瘤菌;近年来命名的具有明确临床意义的细菌,如空间罗氏菌;VITEK 2 Compact 鉴定率低或鉴定错误的细菌,如解糖葡萄球菌、马耳他布鲁杆菌^[8]等;以及专性厌氧性细菌,如二路普雷沃菌和阴道阿托波菌^[12]。

研究^[3-5]发现,厌氧菌、条件致病菌、少见菌^[13]等引起的感染有增加趋势,给临床诊断和抗感染治疗带来困难,而基于 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序可提供快速、准确的病原学结果,帮助临床医生针对性选用抗菌药物。由于大多苛养菌、厌氧菌不常规进行药敏而经验用药,如无准确的病原菌鉴定将误导临床诊治,马耳他布鲁杆菌如使用广谱抗菌药物治疗则临床无效,改用胞内药物(利福平、多西环素)后患者很快好转。5 号菌的准确鉴定使得临床确诊鼻疽奴卡菌病,并使用敏感的磺胺类药物,结合颅脑手术治疗,患者病情得以控制并很快好转。甲硝唑可有效治疗厌氧菌感染,而二路普雷沃菌和阴道阿托波菌对甲硝唑天然耐药,此 2 例患者更换抗

菌药物(美洛西林/舒巴坦和克林霉素)治疗后很快好转。解糖葡萄球菌感染患者死亡,查病例发现该患者有入住重症监护病房(ICU)、多器官功能衰竭、感染性休克、混合细菌血流感染(解糖葡萄球菌和肺炎克雷伯菌)、年龄大等危险因素,最终导致死亡。产单核细胞李斯特菌是致命的食源性病原体之一,其易引起免疫功能低下或有基础疾病、老年人等发生血流感染、中枢神经系统感染等,因此对其准确的病原诊断非常重要。

综上所述,分子诊断在各类细菌感染诊断中具有明显优势,随着测序技术的不断发展和基因数据库的不断完善,基于细菌 16S rRNA 的测序方法在临床病原菌鉴定中的应用将越来越广,但 16S rRNA 是所有细菌共有,通用引物 PCR 扩增时一定严格控制污染,避免扩增假阳性而误导临床。另外,对于混合感染患者直接进行 16S rRNA 扩增和测序会导致鉴定率低或双峰,从而影响鉴定,因此 16S rRNA 的测序方法在非纯菌落或混合感染标本的直接检测中受限;对于种属间相似性较高($\geq 99\%$)的近缘菌,如溶血葡萄球菌等凝固酶阴性葡萄球菌间的鉴定分辨率低,且由于基因突变或基因转移等因素会影响 16S rRNA 鉴定率^[14],必要时需联合 gap 基因测序提高鉴定准确率^[11]。因此,16S rRNA 的测序方法应与表型方法,以及相关试验方法相结合,进行综合分析,以获得科学、准确的病原学结果,为临床诊断和改善感染患者预后提供帮助。

[参 考 文 献]

- [1] 黄林,顾迟,唐沪强. Vitek 2 Compact 系统鉴定临床少见疑难细菌的应用及评价[J]. 检验医学,2014,29(11):1175-1177.
- [2] 孙长贵,成军. 分子诊断技术在临床微生物学检验中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(2):109-112.
- [3] 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.
- [4] 蔡莹,魏建波,鲍亚萍,等. 建立 16SrDNA 的 PCR-SBT 法细菌鉴定及在败血症中的应用[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(10):2161-2164.
- [5] 郭建,吴文娟. 血流感染分子诊断的研究进展[J]. 检验医学,2014,29(6):584-589.
- [6] 倪语星. 关注分子技术在临床微生物检验中的应用[J]. 检验医学,2014,29(6):581-583.
- [7] Kumar A, Asthana M, Gupta P, et al. 16S rRNA sequencing of dye decolorizing bacteria isolated from soil[J]. Bioinformatics, 2015, 11(1): 1-5.
- [8] Sidor IF, Dunn JL, Tsongalis GJ, et al. A multiplex real time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals[J]. J Vet Diagn Invest, 2013, 25(1): 72-81.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. MM18-A interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- [10] 薛鹏飞,王培昌,闵嵘,等. 脑脊液引流液中分离出放射根瘤菌 1 例[J]. 中国感染控制杂志,2014,13(1):56-57.
- [11] Liu C, Shen D, Guo J, et al. Clinical and microbiological characterization of *Staphylococcus lugdunensis* isolates obtained from clinical specimens in a hospital in China[J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1):168-172.
- [12] Knoester M, Lashley LE, Wessels E, et al. First report of *Atopobium vaginae* bacteremia with fetal loss after chorionic villus sampling[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1684-1686.
- [13] 曹敬荣,闵嵘,王培昌,等. 1 例尿路感染患者尿液检出 *Candida nivariensis*[J]. 临床检验杂志,2013,35(11):877-878.
- [14] 叶乃芳,凌华志,黄颖,等. 16SrRNA 序列分析技术对临床标本中疑难细菌的鉴定[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(7): 1000-1003.

(本文编辑:豆清娅)