

迟缓埃格特菌的 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 鉴定及生物学特征研究

李祥云¹, 王中新¹, 朱帮强², 潘亚萍¹, 周寅第¹, 胡媛媛¹, 宋国滨¹, 徐元宏¹

摘要 目的 鉴定两株迟缓埃格特菌临床分离株。方法 选取两株厌氧血培养瓶培养出的分离菌株,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和革兰染色鉴定分离株,药敏实验采用琼脂稀释法。同时提取菌株基因组 DNA,选用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,回收和纯化产物后进行测序,与 GeneBank 数据库中已知菌序列进行比对,并构建系统发育树。结果 MALDI-TOF MS 与 16S rRNA 基因检测均鉴定分离株是迟缓埃格特菌。药敏实验显示该菌对青霉素、哌拉西林-他唑巴坦、氨苄西林-舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、甲硝唑和克林霉素敏感。结论 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 检测可用于迟缓埃格特菌等罕见菌的鉴定。

关键词 迟缓埃格特菌; MALDI-TOF MS; 16S rRNA; 药敏实验

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0191-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.005

迟缓埃格特菌是一种专性厌氧革兰阳性杆菌,生长缓慢,5 d 内可形成肉眼可见菌落,1935 年科学家埃格特首次从人类粪便中分离出该菌,最初归类在厌氧杆菌属中,1999 年完成测序后细分为埃格特属^[1-2]。该菌主要存在于消化道内,也是阑尾炎、肝脓肿和皮肤脓肿的病原菌,但原发疾病后进入血液,形成菌血症,却很罕见。血培养厌氧菌阳性在临床以脆弱拟杆菌和艰难梭状芽孢杆菌多见^[3-5],迟缓埃格特菌阳性的菌血症较为少见,2014 年韩国才报道该国首例迟缓埃格特菌引起的菌血症^[6]。安徽医科大学第一附属医院近 3 年的血培养厌氧阳性菌中,仅有 2 例此菌的鉴定。另外,迟缓埃格特菌导致

的菌血症病死率较高,达到 22%~43%,应引起足够的重视^[7-9]。该文对 2 例血培养阳性标本进行细菌培养和分离,进行迟缓埃格特菌的鉴定和药敏研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 安徽医科大学第一附属医院检验科 2020 年 1 月和 4 月血厌氧培养阳性鉴定出的两株迟缓埃格特菌。

1.1.2 试剂与仪器 琼脂粉(江门市凯林贸易有限公司),基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)质谱仪(法国生物梅里埃公司),引物(合成)购自上海生工生物公司, DNA marker 和 Premix Taq III(日本 TaKaRa 公司), Vitek MS CHCA 基质液(法国生物梅里埃公司), PCR 仪(ABI9700 型),紫外线凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 常规细菌培养 当天报告阳性的厌氧血培养瓶,取 1 滴接种于血平板、麦康凯平板和巧克力平板上,加入厌氧包在 37 ℃ 和 5% CO₂ 箱厌氧培养 72 h 后,取菌落进行革兰染色镜检,触酶实验。

1.2.2 MALDI-TOF MS 鉴定 挑取纯菌落,加入 70% 甲酸 10 μl,涡旋振荡,取 1 μl 标本涂于靶板,加入 0.5 μl 基质液,待完全干燥后,使用法国生物梅里埃公司的 MALDI-TOF MS 仪进行鉴定,再将质谱图与标准数据库中的质谱图进行匹配。

1.2.3 16S rRNA 基因检测 将原始菌分纯扩大培养后提取原始菌基因组 DNA。正向引物 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和反向引物 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增实验。反应程序如下: 96 ℃ 3 min、96 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,此条件下 35 个循环、72 ℃ 10 min,PCR 反应结束后,1% 的琼脂糖鉴定并使用凝胶回收试剂盒回收所需 PCR 产物片段。试剂盒、引物及测序服务均由合肥通用生

2020-08-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171606); 安徽医科大学第一附属医院博士科研启动基金(编号: BSKY2019038)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 检验科、² 输血科, 合肥 230022

作者简介: 李祥云,女,博士,主管技师;

徐元宏,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

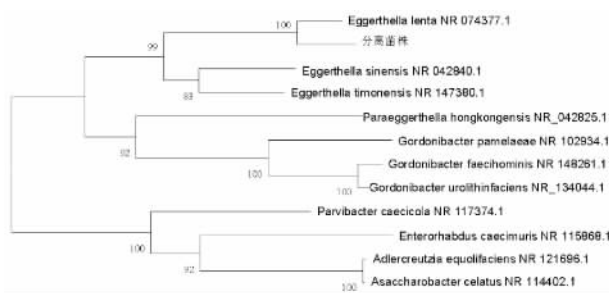


图6 分离菌株的系统发育树

d后,经患者和家属要求出院;②诊断为受压区压疮伴感染、发热和截瘫。治疗上补液,美罗培南抗感染,创面清创换药等处理,并实施慢性溃疡修复和创面密封负压引流术,术后抗生素改为头孢哌酮-舒巴坦。治疗17d后,患处压疮坏死组织已大部清除,无明显渗出物,部分新鲜肉芽组织形成,应患者要求出院。出院后继续定期换药,控制感染。

3 讨论

传统细菌鉴定大多依靠生化反应及血清学检测等,耗时长且准确性差,全自动细菌鉴定分析仪虽能克服这些缺点,但鉴定的细菌种类有限。近年来,MALDI-TOF MS广泛应用于临床实验室细菌和真菌鉴定^[10],具有高达90%以上的鉴定准确率,过程简单快速,且由于数据库的不断完善,给一些临床罕见菌的鉴定也提供了方便。本研究中使用MALDI-TOF MS鉴定出分离菌株是迟缓埃格特菌,置信度为99.9%。同时,通过扩增分离菌株的16S rRNA,鉴定结果和MALDI-TOF MS结果一致^[11-12]。16S rRNA测序技术是最常用的高通量测序组学技术之一,16S rRNA广泛存在于原核生物的细胞中,保留了大量的信息量便于扩增和测序,利用恒定区序列的引物将16S rRNA基因序列扩增出来,可再利用可变区序列的差异对不同属和不同种的细菌进行分类鉴定。16S rRNA基因分析可以快速准确的进行种属鉴定,确定微生物在进化中的位置。根据测序结果进行同源比对构建出系统发育树,确定各个菌种之间的亲缘关系^[13-15]。

参考文献

[1] Eggerth A H. The gram-positive non-spore-bearing anaerobic bacilli of human feces [J]. Journal of Bacteriology, 1935, 30(3): 277-99.

[2] Kageyama A, Benno Y, Nakase T. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen nov, comb nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(4): 1725-32.

[3] Ugarte-Torres A, Gillrie M R, Griener T P, et al. *Eggerthella lenta* bloodstream infections are associated with increased mortality following empiric piperacillin-tazobactam (TZP) monotherapy: a population-based cohort study [J]. Clinical Infectious Disease, 2018, 67(2): 221-8.

[4] Laupland K B, Church D L. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections [J]. Clinical Microbiology Review, 2014, 27(4): 647-64.

[5] Liderot K, Ratchiff P, Lütjhe P, et al. Microbiological diagnosis of *Eggerthella lenta* blood culture isolates in a Swedish tertiary hospital: rapid identification and antimicrobial susceptibility profile [J]. Anaerobe, 2016, 38(4): 21-4.

[6] Lee H J, Hong S K, Choi W S, et al. The first case of *Eggerthella lenta* Bacteremia in Korea [J]. Annals of Laboratory Medicine, 2014, 34(2): 177-9.

[7] Woerther P-L, Antoun S, Chachaty E, et al. *Eggerthella lenta* bacteremia in solid tumor cancer patients: pathogen or witness of frailty? [J]. Anaerobe, 2017, 47(1): 70-2.

[8] Hasteley C J, Boyd H, Schuetz A N, et al. Changes in the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from 2007-2009 to 2010-2012 based on the CLSI methodology [J]. Anaerobe, 2016, 42(1): 27-30.

[9] Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades [J]. Anaerobe, 2015, 31(1): 4-10.

[10] 李蓉蓉, 方亚平, 沈继录, 等. 利用MALDI-TOF MS检测鲍曼不动杆菌对替加环素耐药性的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 540-4.

[11] Febraro F, Rodio D M, Puggioni G, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2: comparison of systems for the identification of microorganisms responsible for bacteremia [J]. Curr Microbiol, 2016, 73(6): 843-50.

[12] Ideleviche A, Grunastel B. Rapid detection and identification of candidemia by direct blood culturing on solid medium by use of lysis-centrifugation method combined with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(1): 97-100.

[13] Nguyen N P, Warnow T, Pop M, et al. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2016, 2(4): 16004-11.

[14] Harmsen D, Karch H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living Tree [J]. Asm News, 2004, 70(1): 19-24.

[15] 孙铭艳, 吴倩倩, 王业鑫, 等. 脓肿分枝杆菌16S rRNA检测及生物学特性研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(12): 901-4.

基于网络药理学的芪参益气滴丸治疗心肌梗死机制研究

魏欣¹, 周仁鹏¹, 刘清武², 胡伟¹, 鲁超¹

摘要 **目的** 采用网络药理学的方法探究芪参益气滴丸治疗心肌梗死(MI)的药理作用机制。**方法** 使用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)检索芪参益气滴丸中药复方中四味草药的所有活性化合物成分和作用靶点;通过OMIM、TTD、PharmGKB、DisGinNET及DrugBank数据库对MI的相关疾病靶点进行检索,并与药物的治疗靶点进行映射,获得药物作用于疾病的靶点。用Cytoscape软件构建药物成分-疾病靶点网络,筛选药物治疗心肌梗死的核心靶点。利用DAVID数据库进行KEGG富集分析,Omicshare数据库进行GO二级分类富集并对KEGG富集的结果进行可视化处理。**结果** 选择口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18,肠上皮细胞膜渗透性(Caco-2)≥-0.4及半衰期

(HL)≥4 h作为活性化合物的ADME筛选条件,共获得82个活性成分和610个成分靶点。五个疾病数据库共检索MI相关靶点1713个,药物靶点映射到疾病中共获得103个靶点。对大于平均度值的27个核心靶点进行DAVID富集分析,发现ADRB2、CHRM3、CHRM2、NOS3、NOS2、ADRA1D、CALM1、PIK3CG、DRD1、PDE3A、F2、GSK3B、COX2、ESR2、ACHE、SCN5A、COX1、PTGS2等18个芪参益气滴丸治疗MI的核心靶点富集到钙信号通路、cAMP信号通路、cGMP-PKG信号通路等19条与MI相关的通路。**结论** 通过使用系统药理学的理论和方法证实了芪参益气滴丸多成分、多靶点、多途径的治疗特点,预测了其治疗MI的可能机制,为其基础研究提供了参考和理论依据。

关键词 芪参益气滴丸;心肌梗死;网络药理学;靶点;信号通路

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0194-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.006

2020-09-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085QH317);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵化计划(编号:2019GMFY03)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心,合肥 230601

²天津天士力制药有限公司,天津 300402

作者简介:魏欣,女,硕士研究生;

鲁超,男,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: luchao@ahmu.edu.cn

心肌梗死(myocardial infarction, MI)已成为心血管疾病死亡的重要原因之一。MI是由冠状动脉的暂时或永久性闭塞引起的部分心肌坏死,继发炎症和心肌缺血损伤,最终发生心力衰竭^[1]。目前,手术、药物

Identification of MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene and biological characteristics of *Eggerthella lenta*

Li Xiangyun¹, Wang Zhongxin¹, Zhu Bangqiang², et al

(¹Dept of Laboratory Medicine, ²Dept of Blood Transfusion,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To identify two clinical isolate strains of *Eggerthella lenta*. **Methods** Two strains isolated from positive blood anaerobic culture were selected. The isolates were identified by MALDI-TOF MS and gram staining. Drug sensitivity test was performed by agar dilution method. At the same time, genomic DNA of the strains was extracted, 16S rRNA universal primer was used for PCR amplification, and the product was sequenced after recovery and purification, which was homologous with the sequences of the known bacteria in GeneBank database. **Results** The isolate was identified as *Eggerthella lenta* by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene assay. Drug sensitivity tests showed that the bacteria was sensitive to penicillin, piperacillin-tazobactam, ampicillin-sulbactam, imipenem, meropenem, metronidazole and clindamycin. **Conclusion** MALDI-TOF MS and 16S rRNA detection can be used for identification of rare bacteria such as *Eggerthella lenta*.

Key words *Eggerthella lenta*; MALDI-TOF MS; 16S rRNA; drug sensitivity test