

trolled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(8): 1290-1301.

[21] Francis JN. The facilitated antigen binding (FAB) assay—a protocol to measure allergen-specific inhibitory antibody activity[J]. Methods Mol Med, 2008, 138(2): 255-261.

[22] Durham SR, Emminger W, Kapp A, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: Confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(6): 717-725.

[23] Shamji M, Ljöring C, Francis JN, et al. Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy[J]. Allergy, 2012, 67(2): 217-226.

[24] Nelson HS, Nolte H, Creticos P, et al. Efficacy and safety of timothy grass allergy immunotherapy tablet treatment in North American adults[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(1): 72-80.

(收稿日期: 2013-10-13)

· 综 述 ·

## 乏养菌属和颗粒链菌属实验室诊断方法的研究进展

徐金莲, 金小希 综述, 杨 燕 审校

(荆门市第一人民医院检验科, 湖北荆门 448000)

**关键词:** 乏养菌属; 颗粒链菌属; 实验室诊断

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.033

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)07-0876-03

乏养菌属和颗粒链菌属为兼性厌氧、触酶阴性的革兰阳性球菌,原来是链球菌属中营养变异菌种,基于 DNA 杂交和 16S rRNA 序列分析比较,分类及命名历经数次较正。目前乏养菌属仅有缺陷乏养菌一个菌种,颗粒链菌属包括 4 个菌种:毗邻颗粒链菌、细长颗粒链菌、副毗邻颗粒链菌和豹鲸颗粒链菌。近年来随着细菌培养分离能力的提高,各种鉴定方法的应用,颗粒链菌属和乏养菌属检出率随之增加,由于它们可引起感染性心内膜炎,引起了临床的普遍关注。本文就这两类细菌的实验室诊断方法的研究进展作一综述。

### 1 表型鉴定法

**1.1 培养特性及形态** 细菌成功的分离培养及镜下形态识别是正确鉴定的前提。临床标本或者血培养物涂片可见细菌而普通培养基中不生长,应考虑乏养菌属和颗粒链菌属感染的可能,可接种在添加半胱氨酸或盐酸吡多醛培养基中,同时加做卫星试验以免漏诊或误诊。

**1.1.1 特殊营养需求** 乏养菌属和颗粒链菌属对营养要求苛刻,培养基中需要特别添加 L-半胱氨酸、盐酸吡多醛或其他含巯基化合物以促进生长。在 5% 马血的心脑浸液、巯基乙酸盐肉汤,以及哥伦比亚琼脂、Schaefer 琼脂、布氏琼脂及巧克力琼脂中可生长,在大多数血培养肉汤中也能生长,这与入血含有的微量吡多醛有关。在 5%~10% CO<sub>2</sub> 及厌氧环境中乏养菌属和颗粒链菌属生长较好,经 18~24 h 培养后可见针尖大小、α-溶血或不溶血菌落,有的需延长至 48~72 h 观察结果。

**1.1.2 卫星现象** 羊血琼脂中浸有吡多醛的纸片或助养菌(如金黄色葡萄球菌)周围,颗粒链菌属和乏养菌属呈“卫星现象”生长,是区别孪生球菌及其他触酶阴性革兰阳性球菌的重要特征。营养丰富的培养基中助养菌远处菌落生长良好,“卫星现象”阴性,易被鉴定为孪生球菌。也有孪生球菌出现“假卫星现象”、懒惰球菌属呈卫星现象及孤单球菌属为吡多醛依赖性的报道<sup>[1-3]</sup>。

**1.1.3 形态与染色** 受所需营养成分、含量及不利培养环境因素的影响,此类菌革兰染色及形态多变。革兰染色时易过度

脱色,镜下同时可见革兰阳性菌和阴性菌,成双或短链状排列,菌体具多形性,如圆形、球形或杆状,细菌类型的错误判断可导致细菌鉴定不出或鉴定错误。营养良好时,菌体形态和染色较典型。采用含 0.001% 盐酸吡多醛的 Todd-Hewitt 或巯基乙酸盐等肉汤培养,大多数菌株呈革兰阳性链球菌样排列,由此可确定细菌形态。

**1.2 生化鉴定** 临床实验室常用生化表型鉴定细菌,但根据生化反应准确鉴定颗粒链菌属和乏养菌属却比较困难,存在的问题有:(1)生化反应谱不典型,与数据库中相应菌株表型不相符;(2)重复性差,同一菌株重复测试,结果可能不相同;(3)数据库未包括菌株信息,仪器不能鉴定数据库未收纳的菌株;(4)检测结果与工作人员读取和解释生化反应所具有的专业知识相关。

目前微生物实验室多采用 API20 Strep、rapid ID32 Strep、VITEK2 等系统鉴定肠球菌、链球菌及相关细菌。由于前二种系统菌库只收录了缺陷乏养菌和毗邻颗粒链菌信息,因而细长颗粒链菌无法鉴定。其中 API20 Strep 系统对这类菌的鉴定性能优于 rapid ID32 Strep 系统。即便如此,3 种系统对数据库中已涵盖的菌株也常会出现种属鉴定错误或未能鉴定出结果<sup>[4]</sup>。

### 2 分子生物学方法

由于分子生物学方法不断发展及其在微生物领域的广泛应用,为不能培养、培养要求高、表型检测不可靠及不能鉴定菌株的快速正确鉴定提供了新思路和新方法。

**2.1 16S rRNA 基因测序分析** 16S rRNA 基因为细菌所共有,含保守序列及可变序列,后者是细菌种属鉴定的分子基础。16S rRNA 测序分析广泛用于细菌鉴定,是临床少见、表型异常、生长缓慢、不能培养及培养阴性的细菌鉴定常用方法<sup>[5]</sup>。目前 16S rRNA 测序分析主要有 2 种方法:(1)利用设计的引物进行基因扩增测序;(2)采用商业化鉴定系统,如 MicroSeq 500 细菌鉴定系统。16S rRNA 测序法对细菌鉴定优于 API20 Strep 系统,是触酶阴性革兰阳性球菌(除肺炎链球菌及溶血链

球菌)鉴定的有效方法。Bosshard 等<sup>[6]</sup>比较了 API20 Strep 系统和 16S rRNA 基因测序法对 171 株触酶阴性革兰阳性需氧球菌的鉴定结果。API20 Strep 系统将 67(39%)株鉴定到种,而 16S rRNA 测序结果显示,API20 Strep 系统仅正确鉴定 25 株,2 种方法结果不一致的有 42 株,而 16S rRNA 测序法能正确鉴定其中的 32 株。采用常规方法对颗粒链菌属和乏养菌属即使鉴定到种,也需 16S rRNA 测序进一步确证。有学者从感染性心内膜炎患者血培养中分离出 1 株类似链球菌细菌, VITEK2 compact 系统鉴定为血链球菌,而 16S rRNA 序列与核酸数据库比对结果显示,其与细长颗粒链菌同源率为 99%,与毗邻和副毗邻颗粒链菌同源率为 97%,结合表型特征鉴定为细长颗粒链菌。基于 PCR 的 16S rRNA 基因测序敏感性高,但对拥有几乎相同 16S rRNA 序列的细菌,此法并不能有效鉴别,须结合生化反应或其他基因位点测序分析进行最终确认。

**2.2 核糖体 16~23 S 间隔区(ITS)分析** 细菌 ITS 序列种内变异性小,种间差异大,是细菌鉴定和分型不错的候选方法。Tung 等<sup>[7]</sup>评价了 ITS 测序分析对 24 种链球菌,1 种乏养菌、18 种肠球菌和 3 种颗粒链菌鉴定结果,正确鉴定率达 98.2%(213/217)。较 16S rRNA 基因,数据库中 ITS 序列相对较少,但其序列更短(189~601 bp),测序效率更高、更准确。随着公共数据库中序列量增加,ITS 分析有望成为类似链球菌属细菌鉴定的首选方法。

**2.3 rpoB 基因分析** rpoB 是编码细菌 RNA 聚合酶亚基的基因,也是鉴定许多细菌的合适靶基因。740 bp rpoB 片段测序分析可用于乏养菌属和颗粒链菌属的鉴定。Drancourt 等<sup>[8]</sup>针对 rpoB 基因 740 bp 可变区域邻近 20 bp 保守区带设计引物,对 102 株链球菌和其他属 60 株非链球菌进行 PCR 扩增并测序。102 株链球菌(包括 2 株缺陷乏养菌和 1 株毗邻颗粒链菌)均有扩增产物;除 2 株蜡样芽孢杆菌外,其他 58 株非链球菌并无扩增产物。经测序分析可将链球菌属、肠球菌属、李生球菌属、乏养菌属和颗粒链菌属鉴定至种水平。

**2.4 groESL 基因分析** groES 和 groEL 基因是细菌广泛存在、进化中呈高度保守的基因,也被称作 cpn10/60 或 hsp10/60 基因。近年来的多项研究对 groESL 在细菌鉴定中应用进行了评价<sup>[9-11]</sup>。groESL 基因也可用于肠球菌和链球菌的鉴定。Hung 等<sup>[12]</sup>根据已获取的 groESL 基因序列,应用多重 PCR 可简单快速准确鉴定乏养菌、颗粒链菌和李生球菌到属。虽然仅能鉴定至属,但可与其他链球菌相区别,从而降低鉴定错误率,而且无菌标本可直接检测。

**2.5 DNA 阵列技术** 近年来,DNA 阵列技术已成功用于难以检测至种细菌的鉴定,如草绿色链球菌、军团菌、结核分枝杆菌和食源性细菌等<sup>[13-15]</sup>。这种方法包括 DNA 提取、特异性区域的 PCR 扩增、标记荧光染料 PCR 产物与一组固定和支持物如玻片或尼龙膜上特异性寡核苷酸探针杂交,其敏感性和特异性主要取决于寡核苷酸探针序列。Tung 等<sup>[16]</sup>应用寡核苷酸阵列技术,对分属于乏养菌属(1 种)、肠球菌属(18 种)、颗粒链菌属(3 种)、链球菌属(31 种和 6 个亚种)的 312 株细菌和 73 株非目标菌株进行鉴定。该方法敏感性和特异性分别为 100%(312/312)和 98.6%(72/73),可将缺陷乏养菌、毗邻颗粒链菌、细长颗粒链菌和豹鲸颗粒链菌正确鉴定至种。从已分离出的菌落至目测杂交图谱,整个过程 8 h 内可完成。如果有大量细菌需鉴定至种(溶血链球菌除外),DNA 阵列技术是一种可供选择的常规方法,主要缺点是公共数据库中 ITS 序列有限。

**2.6 荧光原位杂交法(FISH)** FISH 通过荧光标记的探针发出明亮信号检测病原体,适用于临床标本中常见病原菌的快速鉴定。Gescher 等<sup>[17]</sup>采用一组属和种特异性探针,对 FISH 直接鉴定 428 份革兰阳性球菌血培养标本进行了评价,其设计的 8 种探针组合能覆盖与临床相关的大多数革兰阳性球菌,鉴定敏感性为 98.65%,特异性为 99.0%。按操作流程,可将颗粒链菌属与肠球菌属、链球菌属正确区分。荧光探针除可检测固定在玻片上的细菌标本,还可检测组织切片中的细菌。Mallmann 等<sup>[18]</sup>采用一组探针与 54 份可疑感染性心内膜炎患者的心脏瓣膜组织切片杂交,可检测链球菌、葡萄球菌、肠球菌等大多数细菌。较 PCR 技术,FISH 可同时检测与鉴定组织内的细菌,可提供组织中细菌形态、数目、活性、空间分布等信息<sup>[19]</sup>。实验室采用的 DNA 寡核苷酸探针最常用的靶基因是 16S rRNA,因而可设计各种特异性探针,与其他新探针能自由组合,成本低;同时 FISH 检测速度快,3~6 h 能快速鉴定病原体,较常规方法可提前 48 h,适合普通实验室开展常规工作。

**2.7 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)** MALDI-TOF MS 是近年来兴起的一种用于细菌快速鉴定的基于蛋白质组学的新技术,已广泛用于临床微生物的快速检测。多项研究显示,MALDI-TOF MS 法对乏养菌和颗粒链菌鉴定较表型法准确。Holler 等<sup>[20]</sup>采用 MALDI-TOF MS 法,将 1 例感染性心内膜炎患者血培养中分离出的细菌鉴定为缺陷乏养菌,得分大于 2.0,与作为对照的 16S rRNA 测序结果相同,而 VITEK2 鉴定为缺陷乏养菌的可信度仅为 88%。Davies 等<sup>[21]</sup>比较了 MALDI Biotyper MS、API20 Strep、BD Phoenix 系统对溶血链球菌鉴定结果,除对温和链球菌群(64%)及副血链球菌的低鉴定率(50%)外,MALDI Biotyper 系统对毗邻颗粒链及其他链球菌均能可靠鉴定至种,另外 2 种系统未能鉴定毗邻颗粒链球菌。

### 3 小结与展望

较常规表型方法,基于 PCR 的分子生物学方法对乏养菌属和颗粒链菌属的鉴定快速准确,敏感性高,对不能培养的标本、可疑感染性心内膜炎患者标本、用了抗菌药物治疗的标本检测较为重要,但是标本直接 PCR 的检测结果不能区分活菌、死菌及污染 DNA,血或组织标本中抑制因子可致 PCR 呈假阴性,因而 PCR 结果须结合临床资料综合判断。与表型法和基因检测比较,MALDI-TOF MS 快速、准确、经济及重复性好,但需对不常见菌数据库及时更新及完善。随着操作程序标准化,数据库的不断更新及对结果解读的谨慎性,分子生物学方法将越来越受重视。由于分子生物学方法不能提供具体药敏信息,不能取代传统培养方法,各实验室可根据自身条件,将表型鉴定与分子生物学方法结合,有助于抗菌药物合理治疗及对流行病学、临床意义的深入了解。

### 参考文献

- [1] Leung DT, Davis EM, Qian Q, et al. First report of prosthetic joint infection by *Gemella sanguinis* and associated "pseudosatellitism" phenomenon on culture[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3395-3397.
- [2] Ruoff KL. Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(4): 1129-1133.
- [3] 李金钟,刘利平. 乏养菌属和颗粒链菌属的分类与鉴定[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(4): 312-313.
- [4] Cargill JS, Scott KS, Gascoyne-Binzi D, et al. *Granulicatella* infec-

- tion; diagnosis and management [J]. J Med Microbiol, 2012, 61 (6): 755-761.
- [5] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Then and now; use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(10): 908-934.
- [6] Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, et al. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2065-2073.
- [7] Tung SK, Teng LJ, Vaneechoutte M, et al. Identification of species of abiotrophia, enterococcus, granulicatella and streptococcus by sequence analysis of the ribosomal 16-23 S intergenic spacer region [J]. J Med Microbiol, 2007, 56(4): 504-513.
- [8] Drancourt M, Roux V, Fournier PE, et al. rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera streptococcus, enterococcus, gemella, abiotrophia, and granulicatella [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 497-504.
- [9] Chiang YC, Lu HC, Li SC, et al. Development of PCR primers and a DNA microarray for the simultaneous detection of major Staphylococcus species using groESL gene [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(3): 249-257.
- [10] Chen HJ, Tsai JC, Chang TC, et al. PCR-RFLP assay for species and subspecies differentiation of the Streptococcus bovis group based on groESL sequences [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(4): 432-438.
- [11] Minana-Galbis D, Urbizu-Serrano A, Farfan M, et al. Phylogenetic analysis and identification of Aeromonas species based on sequencing of the cpn60 universal target [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(19): 1976-1983.
- [12] Hung WC, Tseng SP, Chen HJ, et al. Use of groESL as a target for identification of Abiotrophia, Granulicatella, and Gemella species [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3532-3538.
- [13] Chen CC, Teng LJ, Kaiung S, et al. Identification of clinically relevant viridans streptococci by an oligonucleotide array [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1515-1521.
- [14] Zhou G, Wen S, Liu Y, et al. Development of a DNA microarray for detection and identification of Legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 145(1): 293-300.
- [15] Lin MC, Huang AH, Tsen HY, et al. Use of oligonucleotide array for identification of six foodborne pathogens and Pseudomonas aeruginosa grown on selective media [J]. J Food Prot, 2005, 68 (11): 2278-2286.
- [16] Tung SK, Teng LJ, Vaneechoutte M, et al. Array-based identification of species of the genera abiotrophia, enterococcus, granulicatella, and streptococcus [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(12): 4414-4424.
- [17] Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32 Suppl 1: S51-59.
- [18] Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, et al. Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis; a pilot study [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(6): 767-773.
- [19] Moter A, Musci M, Schmiedel D. Molecular methods for diagnosis of infective endocarditis [J]. Curr Infect Dis Rep, 2010, 12(4): 244-252.
- [20] Holler JG, Pedersen LK, Calum H, et al. Using MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid and accurate diagnostic tool in infective endocarditis; a case report of a patient with mitral valve infective endocarditis caused by abiotrophia defectiva [J]. Scand J Infect Dis, 2011, 43(3): 234-237.
- [21] Davies AP, Reid M, Hadfield SJ, et al. Identification of clinical isolates of  $\alpha$ -hemolytic streptococci by 16S rRNA gene sequencing, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using MALDI Biotyper, and conventional phenotypic methods; a comparison [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(12): 4087-4090.

(收稿日期: 2013-10-15)

• 综 述 •

## 高密度脂蛋白亚类在临床相关疾病中的分布特征

孔路科 综述, 连云芝<sup>△</sup> 审校

(晋城市人民医院检验科, 山西晋城 048000)

关键词: 高密度脂蛋白; 亚类; 疾病; 分布特征

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)07-0878-04

传统的流行病学资料显示高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平与动脉粥样硬化和冠心病的发生及严重程度呈负相关。近些年的研究认为仅测定 HDL-C 水平并不能完全反映 HDL 在胆固醇逆向转运、抗氧化、抗炎过程中所起的作用, HDL 颗粒的组成和含量的变化对临床相关疾病的预测能力比单纯测定 HDL-C 更可靠。

### 1 HDL 的组成及分类

HDL 是由肝脏及小肠黏膜细胞合成的。新生的 HDL 呈

盘状, 仅含有载脂蛋白 A-I 和少量极性脂质; 成熟的 HDL 呈球状, 主要由蛋白质、磷脂、胆固醇和三酰甘油等组成, 其中的载脂蛋白以 A-I 为主, 约占 65%。

根据 HDL 的颗粒大小和密度不同, 利用密度梯度超速离心法可以将 HDL 分为 HDL<sub>1</sub>、HDL<sub>2</sub>、HDL<sub>3</sub> 3 种亚类<sup>[1]</sup>。根据颗粒表面携带的电荷不同, 利用琼脂糖梯度凝胶电泳法将 HDL 分为  $\alpha$ -HDL 及前  $\beta$ -HDL 2 种亚类, 采用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法又可进一步将  $\alpha$ -HDL 可分为 HDL<sub>2b</sub>、HDL<sub>2a</sub>、