

洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 的分类鉴定研究进展

余萌, 王似锦, 马仕洪* (中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要 **目的:** 探讨适用于药品微生物控制中的洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 的鉴定策略。**方法:** 结合药品微生物控制中对Bcc的鉴定和分型需求, 对目前应用较为广泛的微生物鉴定技术的特点和鉴定或分型能力进行阐述和讨论, 提供满足不同鉴定水平要求的鉴定策略。**结果:** 对于Bcc, 不同的鉴定方法能达到的鉴定水平存在差异。手动/自动化的生化鉴定系统可达到属/菌群水平的准确鉴定; 基质辅助激光解吸电离飞行质谱 (MALDI-TOF MS) 以及16S rRNA序列分析技术可达到菌群的准确鉴定; 看家基因如 *recA* 或 *hisA* 等的序列分析, 基本可达到菌种水平的鉴定, 必要时, 可补充多位点序列分型 (MLST) 进行确认。MLST、核糖体分型 (Ribotyping) 或全基因组测序 (WGS) 技术则适用于菌株水平的分型和溯源。**结论:** 明确不同的鉴定技术对于Bcc的鉴定能力和应用特点, 针对不同的鉴定需求给出相应鉴定方法的建议, 为在实际应用中涉及Bcc检验、鉴定和溯源分析的生产企业、检验人员提供参考和借鉴。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌群; 鉴定策略; 16S rRNA; 看家基因; 基因分型

中图分类号: R95; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)07-0758-14
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.07.004

Advances in Taxonomy and Identification of *Burkholderia cepacia* Complex

Yu Meng, Wang Sijin, Ma Shihong* (National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To explore the identification strategy of suitability for *Burkholderia cepacia* Complex (Bcc) in the control of pharmaceutical microorganisms. **Methods:** Considering the requirements of Bcc identification and typing in pharmaceutical microbial control, the characteristics and capabilities of identification or typing of microbial identification techniques widely used at present were described and discussed, and identification strategies to meet the requirements of different identification levels were provided. **Results:** For Bcc, different kinds of identification methods are able to achieve different identification levels. Manual/Automated biochemical identification systems are able to achieve accurate identification at the genus/complex level; matrix-assisted laser desorption ionization flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rRNA sequence analysis technology are able to achieve accurate identification of "Complex" level; housekeeping genes sequence analysis such as *recA* or *hisA*, etc., are able to basically reach the species level. If necessary, multilocus sequence typing (MLST) should be supplemented for confirmation. MLST, Ribotyping and Whole Genome Sequencing (WGS) technology are suitable for strain-level typing and traceability. **Conclusion:** The identification ability and application characteristics of different identification technologies for Bcc are clarified, and corresponding identification

methods are recommended for different identification requirements, so as to provide references for manufacturers and inspectors involved in Bcc inspection, identification and traceability analysis in practical application.

Keywords: *Burkholderia cepacia* Complex; identification category; 16S rRNA; housekeeping gene; genotyping

洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* Complex, Bcc) 隶属于伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)，由若干种表型近似但基因型存在差异的菌种组成，代表菌种为洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*, *B.c*)。1980年，美国某吸入剂生产企业由于去离子水制备系统控制失败，致使产品污染*B.c*，导致数名囊性纤维化 (Cystic fibrosis, CF) 患者死亡，该菌由此引起FDA的关注。Bcc广泛分布在水、土壤等生态环境中，能够利用多种有机物作为其单一代谢能源，对营养需求较低，有研究表明*B.c*可在蒸馏水中存活数月。Bcc通常能够耐受常见的抗生素、消毒剂、抑菌剂，在没有有效检测方法时，低数量的Bcc污染制药行业水系统，无法被药典中目前使用的微生物限度检查方法有效检出，而一旦Bcc经过积累形成生物膜，基于其上述特性，将难以被彻底清除，并最终被引入终产品。近年来，不断有产品由于污染Bcc，或在其生产过程中出现Bcc，且有引入终产品的风险而被召回。无论是监管方还是整个制药行业对于Bcc的关注日益增加，对终产品或其生产过程中的Bcc进行准确有效的识别成为Bcc污染风险控制的关键点，同时也是难点之一。

1 Bcc分类概述

*B.c*由康奈尔大学植物病理学家Burkholder于1950年首次在腐烂的洋葱根茎发现，最初被命名为洋葱假单胞菌 (*P.cepacia*)^[1]，Palleroni等^[2]依据rRNA-DNA杂交结果将假单胞菌属的菌株分为5个大的类别 (Group)，分别为以铜绿假单胞菌为代表的I组；以洋葱假单胞菌为代表的II组；以*P.acidovorans*为代表的III组；以*P.paucimobilis*为代表的IV组；以*P.maltophili*为代表的V组。1992年Yabuuchi等^[3]通过多相分类学，依据16S rRNA序列、DNA-DNA杂交同源性、表型特征和脂肪酸组

成等，将II组重新分类至一个新的属，并以最初发现该菌的科学家姓氏命名，即*Burkholderia*。

1997年，Vandamme等^[4]将128株*Burkholderia*的菌株进行包括表型和基因型的系统分析，结果表明，通过生化或细胞脂肪酸组成分析被鉴定为“*B.c*”的若干菌株，在DNA-DNA杂交中可进一步被划分为至少5个不同的基因型亚群 (Genotypic Subgroups)。在同年5月召开的洋葱伯克霍尔德菌国际工作组第三次会议 (Third Meeting of the International *Burkholderia cepacia* Working Group, May 10 to 11, 1997, Victoria, British Columbia, Canada) 上，提议将上述表型特征近似的基因型亚群命名为Bcc，并针对这一表型近似，但基因型存在差异的分类学特点，采用“基因型 (Genomovar)”这一名称对不同亚群进行命名，至此，Bcc产生了5个基因型，分别是基因型 I (对应种名：*B.c*)、基因型 II (*B.multivorans*)、基因型 III (*B.cenocepacia*)、基因型 IV (*B.stabilis*) 和基因型 V (*B.vietnamiensis*)。在此后二十余年中，随着分子生物学的飞速发展，基因水平的信息为Bcc的准确分类提供了新的角度和依据，多位点序列分型、全基因组测序等技术在Bcc分类学研究中发挥了重要的作用，不断有新的Bcc成员被命名，截至2021年，已被分类命名的Bcc成员达到了24个种，分别是*B.c*、*B.multivorans*、*B.cenocepacia*、*B.stabilis*、*B.vietnamiensis*、*B.dolosa* (genomovar VI)、*B.ambifaria* (genomovar VII)、*B.anthina* (genomovar VIII)、*B.pyrrhocinia* (genomovar IX)、*B.latens*、*B.diffusa*、*B.arboris*、*B.seminalis*、*B.metallica*、*B.ubonensis*、*B.contaminans*、*B.lata*、*B.stagnalis*、*B.territorri*、*B.pseudomultivorans*、*B.catarinensis*、*B.puraquae*、*B.paludis*和*B.aenigmatica* (表1)^[3-20]。

表1 Bcc 已分类命名种

序号	名称	中文名称	参考文献
1	<i>B.cepacia</i>	洋葱伯克霍尔德菌	[3]
2	<i>B.multivorans</i>	多噬(食)伯克霍尔德菌	[4]
3	<i>B.cenocepacia</i>	新洋葱伯克霍尔德菌	[11]
4	<i>B.stabilis</i>	稳定伯克霍尔德菌	[7]
5	<i>B.vietnamiensis</i>	越南伯克霍尔德菌	[5]
6	<i>B.dolosa</i>	狡猾伯克霍尔德菌	[12]
7	<i>B.ambifaria</i>	双向伯克霍尔德菌	[9]
8	<i>B.anthina</i>	花园伯克霍尔德菌	[10]
9	<i>B.pyrrocinia</i>	吡咯菌素伯克霍尔德菌	[4]
10	<i>B.latens</i>	隐蔽伯克霍尔德菌	[13]
11	<i>B.diffusa</i>	广布伯克霍尔德菌	[13]
12	<i>B.arboris</i>	森林伯克霍尔德菌	[13]
13	<i>B.seminalis</i>	种子伯克霍尔德菌	[13]
14	<i>B.metallica</i>	金属伯克霍尔德菌	[13]
15	<i>B.ubonensis</i>	乌汶伯克霍尔德菌	[6]
16	<i>B.contaminans</i>	污染伯克霍尔德菌	[14]
17	<i>B.lata</i>	普通伯克霍尔德菌	[14]
18	<i>B.stagnalis</i>	湖水伯克霍尔德菌	[16]
19	<i>B.territorii</i>	领土伯克霍尔德菌	[16]
20	<i>B.pseudomultivorans</i>	假多噬伯克霍尔德菌	[15]
21	<i>B.catarinensis</i>	圣卡塔琳娜伯克霍尔德菌	[18]
22	<i>B.puraquae</i>	纯水伯克霍尔德菌	[20]
23	<i>B.paludis</i>	沼泽伯克霍尔德菌	[17]
24	<i>B.aenigmatica</i>	神秘伯克霍尔德菌	[19]

2 Bcc的鉴定

对于Bcc的鉴定需求最初源于临床,针对从CF患者或某些免疫缺陷人群的肺部感染样品中分离获得的微生物进行分类学的确认,用以确定病原菌并

采取相应的抗菌治疗。临床实验室通常会使用选择性培养基与传统或商业化生化鉴定结合的方式,判断分离物是否为Bcc。在基于临床需求开发的一些商业化鉴定系统中,Bcc中的成员可能会被误识

别为其他种属的微生物，而与其近似的一些微生物也会被误识别为Bcc，而对Bcc进行种水平的鉴别则更加困难。随着对Bcc认识的深入，基于其生长特性，医药行业对Bcc的关注逐渐从患者（流行病学）向前端转移，在药品生命周期中控制Bcc污染风险的重要性日益凸显。一方面，Bcc能够代谢大多数的碳源，因此利用生理生化反应进行种水平鉴别本身就存在较大的困难。另一方面，与临床样本不同，药品及其生产环境中的微生物多处于寡养、低温、消毒剂、抑菌剂等不利于生长的条件下，这使得分离自其中的微生物无法表现出典型的表型特征，给依赖于传统生化鉴定的实验者造成困扰。与传统的生理生化鉴定方法相比，基于基因型的鉴定方法优势显著，可满足分离菌株属、种甚至菌株水平的不同鉴定需求。本研究将针对不同的Bcc鉴定方法从原理和应用方面进行阐述和讨论。

2.1 表型鉴定

2.1.1 选择性培养基

选择性培养基是那些通过添加某些成分，抑制除目标微生物以外的其他微生物生长的培养体系。目前针对Bcc的法定标准检测方法，包括SN/T 4485-2016 进出口口腔清洁类产品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法^[21]；SN/T 4684-2016进出口化妆品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法^[22]；美国药典USP43-NF38 <60>非无菌产品的洋葱伯克霍尔德菌群检查（Microbiological Examination of Nonsterile Products—Tests for *Burkholderia cepacia* Complex）^[23]。上述方法的检测流程均按照样液制备、增菌培养、选择和分离培养及结果判断几个环节展开（表2）。即目前的标准方法都是利用选择性培养基对样品中复苏的微生物进行筛选培养，使得Bcc获得优势生长，同时抑制其他种类的微生物。对选择和分离培养中生长且被认为高度疑似Bcc的菌落，仍需通过进一步的鉴定判定，但选择性培养基无疑通过利用Bcc与其他微生物生长代谢特性的差异，将表型鉴定的原理实践至一种个性化的培养体系，在对样品中是否含有Bcc的初步筛查中起到重要的作用。

上世纪80年代初，研究者用麦康凯琼脂、添加5%绵羊血和木糖赖氨酸的哥伦比亚琼脂和添加5%绵羊血、多粘菌素B及杆菌肽的TSA对*B.c*进行选择培养。1985年，Gilligan等^[24]研发了针对*B.c*

的选择性培养基PCA，后续在此基础上对其配方进行了进一步改良，调整了碳源、氮源抑菌物质的含量，并通过pH缓冲剂降低培养基的初始pH值，形成商品化的Bcc选择性培养基Mast BCA和Oxiod BCA，后者被进出口检验检疫标准SN/T 4485-2016收载。1987年，David等^[25]在乳糖氧化发酵培养基的基础上，添加了用于筛选的抗生素，形成针对*B.c*的另一种选择性培养基OFPBL，1997年Henry等^[26]在此培养基基础上进行改良，添加了蔗糖、酵母浸粉，增加了胰蛋白胍的含量，调整了抗生素的种类及浓度，最终形成了另一种目前主要应用的，也是USP<60>和进出口检验检疫标准SN/T 4684-2016中收载的选择性培养基配方（BCSA）。Henry等^[27]对当时主要的3种Bcc选择性培养基（分别是BCSA、PCA及OFPBL）进行了Bcc促生长能力以及非Bcc抑制能力的讨论。该研究对来自儿童和成人的656份临床样本进行了Bcc的筛查，对其中筛选确认的81株Bcc菌株进行了进一步选择性培养基的比较。研究表明，培养至72小时，BCSA对Bcc菌株的复苏比例达100%（81/81），OFPBL和PCA则分别是96%（78/81）和84%（68/81）；从菌株生长状态看，培养至72小时，相同接种量的Bcc菌株，能够达到良好生长状态的菌株数量：BCSA达到69%，OFPBL和PCA则分别为30%和18%。在抑制能力方面，40株非Bcc菌株在BCSA上能够生长，分别有263和116株非Bcc菌株在OFPBL和PCA上生长。基于此结果，BCSA作为Bcc选择性培养基优势显著。2003年Vermis等^[28]用分离自临床和环境的隶属于Bcc 9个基因型的142株菌株对6种选择性培养基的促生长能力进行了考察，其中包括BCSA、Mast BCA和Oxiod BCA等6种培养基，它们对于Bcc的促生长能力在71.1%~99.3%。BCSA上仅有1株*B.stabilis*分离株无法生长，促生长能力达99.3%，Mast BCA和Oxiod BCA分别为98.6%和91.5%，其他3种培养基的促生长能力均在85%以下。这项研究将Bcc的考察范围扩充到了9个基因型，菌株来源也由临床扩大到环境，而Bcc成员目前已增加至24种，它们在表型上虽然近似，但在能源物质的利用上仍存在着差异，选择性培养基对这些新增成员的促生长能力还有待进一步的研究探讨。

表2 各标准进行 Bcc 检验的流程

标准名称	检验流程			
	供试液制备	增菌培养	选择性和分离培养	结果判断
USP<60>	参照USP<61>非无菌产品微生物限度检查法-微生物计数制备	TSB或者稀释的TSB(经方法适用性确认), 30℃~35℃, 48 h~72 h	BCSA, 30℃~35℃, 48 h~72 h	菌落形态, 适宜的鉴定方法
SN/T 4485-2016	SCDLP液体培养基 1:10	改良LETHEEN肉汤, 35℃±1℃, 48 h±2 h	BCA, 35℃±1℃, 48 h±2 h	1步-染色镜检、过氧化氢酶阳性、氧化分解葡萄糖、赖氨酸脱羧酶阳性; 2步-生化鉴定
SN/T 4684-2016	参照GB7918.1制备 1:10稀释液	1步-添加250000 U·L ⁻¹ 多粘菌素B的SCDLP液体培养基; 2步-添加10 mg·L ⁻¹ 庆大霉素的BCSA液体, 36℃±1℃, 各24 h	添加多粘菌素B及庆大霉素的BCSA和添加多粘菌素B及庆大霉素的麦康凯琼脂, 32℃±1℃, 48 h	生化试验、生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统

2.1.2 生化鉴定

选择性培养基可对样品中可能存在的Bcc进行筛选,但其“选择性”是相对的,某些非Bcc菌株可在各种选择性培养基上获得生长,这其中包括非Bcc的伯克霍尔德菌[如唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*)]、一些与Bcc生长特性近似的革兰氏阴性菌,以及一些真菌。因此,选择性培养基上生长的微生物,仍需进一步通过其他鉴定方法进行Bcc的确认。基于微生物生长代谢的生化鉴定方法,在分子生物学应用于微生物分类学之前一直被视为微生物鉴定的权威方法,直至今日仍在广泛应用。随着科学技术的发展,检测实验室多数已无需进行复杂繁琐的手动生化鉴定试验,商品化的成熟生化鉴定系统即可满足大多数分离细菌的鉴定需求。但生化鉴定方法对于Bcc的鉴定能力有限。根据《伯杰氏系统细菌学手册》^[29],*B.c*可利用多种糖苷类、醇类、酸类、氨基酸、胺类及芳香族化合物作为其碳源,代谢谱极为广泛,这不同于非Bcc的其他*Burkholderia*以及不同属微生物。由于Bcc成员间的代谢差异较小,以致生化鉴定可对部分未知菌株是否为*Burkholderia*,乃至是否为Bcc进行较为准确的判断,但很难对Bcc成员

之间进行区分。Kiska等^[30]在1996年对4种商业化鉴定方法进行了比较,结果表明,这些生化鉴定系统对于*B.c*鉴定的准确率为43%~86%,某些非Bcc菌株会被错误鉴定为*B.c*,且当采用这些生化鉴定系统进行Bcc的鉴定时,需补充必要的传统手动生化反应测试。Shelly等^[31]则进一步对7种商业化生化鉴定系统开展Bcc鉴定分析,得出了近似的研究结论。Henry等^[32-33]对传统生化鉴定、商业生化鉴定系统以及分子生物学方法进行比较,建议通过分子生物学鉴定方法对生化鉴定进行补充,以实现Bcc菌群水平和种水平的准确鉴定。

2.1.3 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)技术是利用微生物核糖体组成部分,即几十种相对保守的核糖体蛋白作为分析对象,不同种属微生物的核糖体蛋白组成存在差异, MALDI-TOF MS针对分离纯化的单一菌株进行核糖体蛋白荷质比的获取,形成特异性的核糖体蛋白图谱,以此作为微生物鉴定的依据。MALDI-TOF MS技术应用于细菌鉴定已近30年,近年来逐渐被研究者用于Bcc复合

群乃至群内成员间的鉴别。Fernandez-Olmos等^[34]在2012年的一项针对临床CF患者分离菌株的鉴定研究中指出,对于Bcc, MALDI-TOF MS鉴定结果的准确性显著优于传统的生化方法,某些使用生化方法鉴定为Bcc的菌株,经MALDI-TOF MS和16S rRNA序列分析比对确认后鉴定为*B.gladiali*、*Pandoraea spp.*、*Achromobacter xylosoxidans*,以及*Pseudomonas huttiensis*。Vanlaere等^[35]对75株Bcc及Bcc近缘菌株进行鉴定分析, MALDI-TOF MS对9个Bcc种表现出良好的属水平鉴定效果,对7个种可达到种水平的准确鉴定。Lambiase等^[36]使用MALDI-TOF MS对57株临床分离Bcc菌株进行鉴定,并与recA基因的PCR-RFLP结果进行比对,结果表明,57株菌株分别隶属于*B.c.*、*B.cenocepacia*、*B.stabilis*、*B.vietnamiensis* 4个种, MALDI-TOF MS方法结果与PCR-RFLP结果能够良好对应。Wong等^[37]对Bcc 22个种的95株菌株进行2种MALDI-TOF MS方法的鉴定准确性研究,以recA基因序列的鉴定结果为判断标准,结果表明,不同质谱鉴定平台对不同Bcc种水平成员的鉴定准确性存在差异,主要表现在2种平台数据库中收录的Bcc种水平成员的蛋白质图谱数量不同, Biotyper System (Bruker Daltonics) 收录了14个Bcc种水平成员的核糖体蛋白图谱, VITEK MS System (bioMérieux) 则收录了16个,未收录的菌种不可能在该项鉴定中获得种水平的可靠结果; Biotyper System对Bcc属水平的鉴定结果准确性是100%, VITEK MS System为97%,其中*B.cenocepacia* III B和*B.pseudomultivorans*两个种的部分分离株无法获得正确的属水平鉴定结果;在种水平上,若将数据库未收录的菌株排除后计算, Biotyper System对Bcc菌株鉴定结果与recA序列分析的匹配率为23%, VITEK MS System为80%。综上, MALDI-TOF MS对于Bcc属水平上的鉴定准确性较高,多数情况下可鉴定至菌群水平,但种水平的鉴定可信度较低,不同平台的鉴定效果存在差异。一方面是由其原理本身决定,另一方面是由于Bcc种水平成员在各质谱鉴定平台收录不足,未知菌株无法与对应种的标准菌株图谱进行比对。MALDI-TOF MS技术因其通量高、鉴定耗材成本低且耗时短被临床检验所青睐,但在用其对Bcc进行菌群、菌种及菌株水平的鉴定时,应谨慎看待其鉴定结果的准确性。

2.2 基因型鉴定

2.2.1 16S rRNA序列分析

前期研究表明, Bcc在基因型上与非Bcc的其他伯克霍尔德种存在着显著差异, DNA-DNA杂交结果显示, Bcc种水平成员之间的杂交结合值为30%~50%, Bcc种内的杂交结合值大于70%, Bcc与非Bcc菌种之间的杂交结合值则小于30%^[4]。PCR技术的发展令分类学家们能够更加便捷地获得待测微生物的核酸序列,直接从碱基水平对它们的亲缘关系进行分析。16S rRNA被广泛用于细菌的分类鉴定,被誉为序列水平的细菌鉴定“金标准”。Coenye等^[8]对Bcc及*Burkholderia*其他菌种的16S rRNA序列进行了进化分析,结果表明, Bcc成员之间的16S rRNA相似值为98.3%~99.3%,与非Bcc的伯克霍尔德菌种的16S rRNA相似值则小于98.1%。Vanlaere等^[13]的研究结果表明, Bcc种水平成员之间的16S rRNA相似值大于98%,与非Bcc的伯克霍尔德菌种的16S rRNA相似值则小于97.5%。图1为目前已命名的Bcc种水平成员、非Bcc的*Burkholderia*以及*Paraburkholderia*部分菌株的系统发育邻间树,序列均来源于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)。序列分析结果表明, Bcc成员之间的16S rRNA相似值大于97.8%,与前述Bcc与非Bcc的伯克霍尔德菌之间的16S rRNA相似值小于98%结果不同, *B.pseudomultivorans*与非Bcc的伯克霍尔德菌之间的16S rRNA相似值为97.4%~99.9%,在系统发育分析中, *B.pseudomultivorans*也被聚类至*Burkholderia spp.*分支中。综上,在使用16S rRNA序列分析对菌株进行Bcc鉴定时,对绝大多数的菌株可达到菌群水平的鉴定,而对*B.pseudomultivorans*可能出现鉴定不准确的情况;由于Bcc成员间的16S rRNA序列相似性较高,不足以进行种间区分,因此在对Bcc进行鉴定时,该方法存在种间区分能力较差的问题。序列分析具有低成本、高准确性的优点,目前已有商品化的序列测定仪供试验人员自行进行测序分析,也可根据实际情况对测序试验进行委托。但其方法操作较为繁琐,对人员数据分析能力要求较高,且需配备相应的分子生物学实验室,因此在我国制药行业,具备该鉴定方法能力的生产企业仍占少数,多在检验机构得以应用。

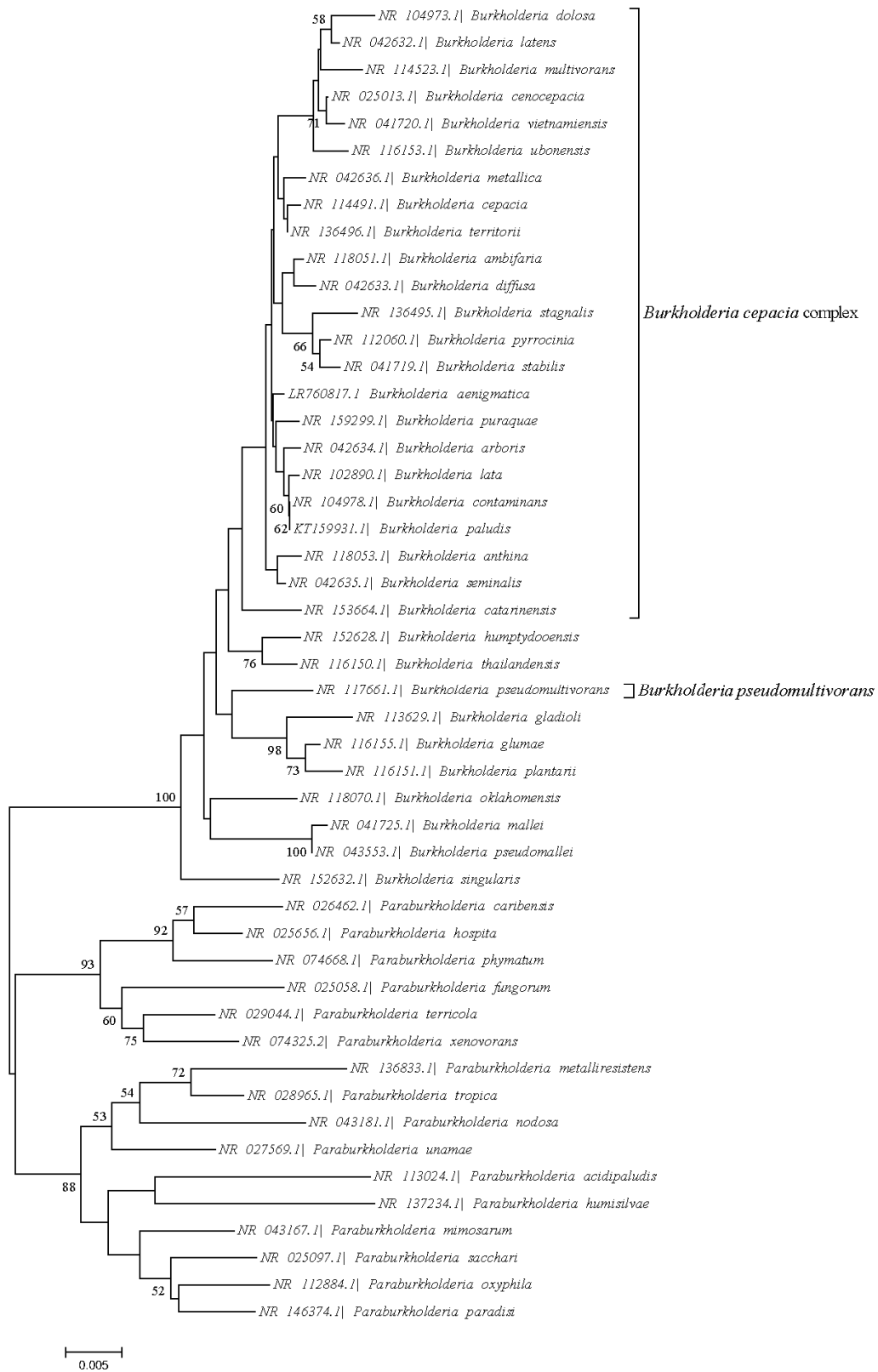


图1 基于16S rRNA序列的 *Burkholderia* 及 *Paraburkholderia* 邻间树
(bootstrap 1000, 仅显示 bootstrap value > 50% 的值)

2.2.2 看家基因序列分析

为了对Bcc进行种水平的准确鉴定,需要增加其他在物种进化过程中的重要基因作为研究对照。recA基因就是这样一个潜在的分子靶标。recA基因编码约350个氨基酸的蛋白,已知参与细菌多项关键生命活动过程,包括同源DNA重组、SOS诱导和DNA损伤修复。此前recA基因已被应用于近缘物种间的系统发育分析,Bcc成员间的recA基因相似值为94.2%~95.6%,而种内相似值为98%~99%^[9]。2000年,Mahenthalingam等^[38]针对Bcc recA基因进行系统发育和限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)序列分析,结果表明,recA的RFLP能将已命名的Bcc菌株明确区分为5个对应Bcc的基因型,而其全序列的系统进化分析则将所有菌株聚类至6簇(Clusters),除了对应的5个基因型,还将基因型III划分为IIIA和IIIB;2003年,Vandamme等^[11]将分离自植物根系和临床的Bcc环境菌株进行DNA-DNA杂交分析,发现它们仍隶属于*B.cenocepacia*,但在recA基因序列的系统发育分析中,则分别聚类至不同的簇,将它们命名为Genomovar IIIC和Genomovar IIID,这些研究结果表明recA可作为Bcc种间区分的良好分子靶标。基于此,recA序列分析被广泛应用至Bcc的种水平鉴定;在考察其他鉴定方法的准确性时,recA序列的鉴定结果也被作为参照。于晓庆等^[39]利用recA基因序列分析鉴定自烟草土壤分离的Bcc株为*B.pyrocinia*。本课题组此前也报道过由于临床药品污染了Bcc导致患者感染的案例,利用recA序列比对及系统发育分析,结合16S rRNA序列分析和生化鉴定,将污染的Bcc菌株分别鉴定为*B.c.*、*B.cenocepacia* (Genomovar IIIB)、*B.stabilis*^[40-42]。周江林等^[43]利用recA全长序列和7个看家基因(Housekeeping Gene)片段串联构建的系统发育树,对临床分离菌株进行鉴定,纠正了5株种水平鉴定有误的菌株。

hisA基因是近年来报道的另一个应用于Bcc种间区分的分子靶标。hisA编码的基因产物是1-(5-磷酸核糖基)-5-[5-磷酸核糖基氨基]亚甲基氨基咪唑-4-甲酰胺异构酶,参与组氨酸的生物合成^[44]。研究表明,Bcc hisA基因中442bp大小的片段可对Bcc的17个已知种达到良好的区分效果,且可将基因型III进一步划分为IIIA、IIIB、IIIC和IIID,

与recA基因的系统发育分析结果吻合,此外,研究还对17个种的hisA基因进行了单核苷酸多态性分析,发现了种水平特异的11个碱基识别密码^[45],给Bcc的种间快速识别提供了便利。

尽管单个看家基因的序列同源性分析已广泛应用于细菌鉴定,但对于Bcc,单个看家基因在种水平的鉴定准确性方面存在局限。以recA基因为例,基于recA-RFLP及序列分析在Bcc的分类学中发挥了重要的作用,但recA序列全长只有1050bp左右,大量试验虽已验证其对Bcc最初发现的种成员区分效果良好,但随着多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)、全基因组测序(Whole Genome Sequencing, WGS)技术的发展,更多的Bcc种成员被发现并命名,说明recA对这些种的区分能力有限。Cesarini等^[46]对26株Bcc菌株进行分析,发现部分菌株在recA序列分析时种水平的指向是*B.cenocepacia*,但在MLST分析时则聚类至独立的簇;recA序列分析指向*B.lata*的菌株在MLST分析时则表现出与*B.contaminans*有更高的亲缘关系。这些结果说明recA在对某些近缘的Bcc种水平上的区分能力不足。本实验室在对Bcc进行多相分类鉴定分析时发现,对于Bcc某些种的菌株,如*B.c.*和*B.contaminans*以及recA和hisA序列分析得到不同的种水平鉴定结果;而对另一些种,如*B.lata*和*B.aenigmatica*,无法通过单个看家基因的序列分析进行区分,均需进一步通过MLST或WGS对这些菌株的种水平进行准确鉴定。

2.3 基因分型

2.3.1 核糖体分型技术

从原理上,核糖体分型(Ribotyping)是对RFLP方法的进一步改良应用。通过计算机预测适用于特定菌种的限制性内切酶,用其对细菌基因组进行酶切,酶切后的片段通过琼脂糖凝胶电泳区分,然后通过Southern Blot转移到尼龙膜上,至此,待测菌被消化后的基因组在膜上得到固定。进一步通过计算机对菌种的核糖体操纵子设计特异性引物,用以合成作为杂交探针的核糖体操纵子,并进行放射性标记。用探针与膜上DNA片段进行杂交,通过放射自显影对杂交后的条带进行显色,最终形成菌株特异性的核糖体基因指纹图谱,用以进一步的鉴定或分型分析^[47]。从原理可知,核糖体分型的研究对象并不局限于核糖体基因本身,限制性

酶切位点可能出现在核糖体基因之外的位点,这将导致最终的核糖体带型中的特异性条带大小分布在1kb~50kb之间。研究者用计算机对细菌基因组进行分析,发现细菌基因组中的某些中性进化(看家)基因,分布在核糖体基因的侧翼,因此核糖体分型反映的DNA限制性酶切多态性,不仅仅针对核糖体,也包括了上述的这些基因^[48]。因此,核糖体分型技术既可以用于系统进化分析,又能够简单针对两个菌株的核糖体带型进行鉴别分型,已被应用于分类学^[49]、流行病学溯源^[50]、地理分布^[51]、系统发育等方面的研究^[51-52]。但传统的核糖体分型技术操作复杂、耗时较长,对实验人员的操作要求高,很难满足实际应用需求。自动化的核糖体分型系统基于此诞生,克服了时间长、人员操作标准化等问题,并且其内置数据库,在获得核糖体带型的同时,可对待测菌株进行分类学的鉴定。Brisse等^[53]利用自动化核糖体分型系统Riboprinter对分离自临床和环境的Bcc菌株进行双酶切分析,发现该方法能对*B.multivorans*、*B.stabilis*及*B.vietnamiensis*进行有效区分,不同菌种菌株的带型聚类为同一分支,结果与16S-RFLP吻合,且同一菌种的不同菌株表现不同的核糖体带型,表明该方法对Bcc有良好的分型能力。Cunha等^[54]对CF患者体内分离的Bcc菌株进行了长达7年的调查研究,结合核糖体分型和多种分子生物学方法开展流行病学分析,Brisse等^[55]也对法国的CF患者开展了类似的研究,这些研究发现*B.cenocepacia*、*B.multivorans*是临床分离种中出现频率较高的Bcc成员,不同种的Bcc呈现出不同的核糖体带型,表明这一方法对Bcc种间的鉴定效果良好,同时,从同一菌种菌株间的带型差异得出与前述文献一致的结论,为流行病学调查提供了重要依据。由于自动化核糖体分型系统中收录的Bcc种成员有限,目前仅有*B.c.*、*B.stabilis*和*B.vietnamiensis*三种,因此其对Bcc的种水平鉴定能力还有待数据库进一步的扩充,但若仅关注分离菌株系统进化关系和其带型差异,则自动化核糖体分型系统不失为一种便捷、快速、良好的污染溯源工具^[40]。

2.3.2 多位点序列分型技术

MLST技术是上世纪末分型技术的一项重大革新。虽然用于微生物基因分型的方法不胜枚举,但不论是RFLP、AFLP、RADP、Ribotyping还是

PFGE,都不可避免地面临着共同的问题,这些基于DNA条带进行分型的技术,带型数据难以在实验室间进行相互验证^[56],而MLST的分析对象则是基因序列的碱基组成,通过对某一菌属/菌群/菌种的若干个(通常是6~11个)中性进化(看家)基因进行多基因位点的序列分析,每一序列都会被随机分配一个数字,每个菌株最终都会获得一串代表其MLST的数字,即该菌株的ST型,不同菌株间的系统发育关系则通过若干个基因的串联序列分析(Multilocus Sequence Analysis, MLSA)实现^[57-58]。MLST的最大优势是序列信息更加便携,不同实验室对相同的一类微生物按照同样的MLST方案进行分型研究,试验数据可相互验证,且目前已有面向全球开放的MLST数据库(<https://pubmlst.org/>),并在不断地进行数据的扩充与纠正,自1998年Maiden等^[59]首次针对脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)设计MLST方案以来, pub-MLST数据库已收录了129个属/种的微生物MLST方案,等位基因数达到2581万条,分离菌达87万株。

2005年, Baldwin等^[60]设计了针对Bcc的MLST方案,通过7个看家基因atpD、gltB、gyrB、recA、lepA、phaC和trpB的序列分析,将119株已分属于9个种的Bcc菌株分为114个ST型,菌种水平的分类学结果与recA-RFLP对应良好,且发现了4组Bcc未命名的种成员,将基因型I即*B.c.*划分为两个亚系(Sublineages),其中一簇是此前命名的TaxonK^[61]。基因型III即*B.cenocepacia*进一步从原有的4个亚组(Subgroups)IIIA、IIIB、IIIC、IIID扩增至IIIE。自Bcc-MLST方法建立以来, Bcc新成员的发现基本都是将MLST分析作为一种可靠的鉴定分型手段^[13-20, 62],且认为当串联等位基因平均分异度(Average Concatenated Allele Sequence Divergence)小于3%时,可进行种水平的判定,与DNA-DNA杂交中种水平判断阈值70%等效^[14-15]。

2.3.3 全基因组测序技术

随着下一代测序技术的飞速发展,研究者们能够便捷地获得微生物整个基因组的信息,不再局限于某一个或若干个基因,这必然将给分类学带来全新的视角。通过NCBI基因组数据库的检索,已上传测序完成图的*Burkholderia*菌株有341株,其中包含了目前已命名的所有Bcc种水平成员。在测序技术普及之前,进行原核生物种水平判断的重

要依据是DNA-DNA杂交的结合值，70%是种水平鉴定的阈值。现在，基于全基因组序列的平均核苷酸一致性（Average Nucleotide Identity, ANI）成为另一个评价两个基因组之间相似性的指标，70%的DNA-DNA杂交值对应的ANI为95%~96%^[63]。多项研究表明，DNA-DNA杂交和ANI已成为原核生物种水平鉴定的金标准^[64-65]。此外，由于传统的DNA-DNA杂交试验操作复杂、耗时长，基于计算机的数字DNA杂交（digital DNA-DNA Hybridization, dDDH）能够直接使用基因组信息进行DNA-DNA杂交值的计算^[66]。Yuan Jin等^[67]选取

了116株Bcc菌株的全基因组中1005个单拷贝同源基因，构建系统发育树，比对经典的16S rRNA、recA、hisA和MLST/MLSA分析，纠正了NCBI数据库中鉴定有误的菌株，并依据种水平区分的阈值区间ANI的上限值96%，将待分析的Bcc菌株聚类为36簇，其中24簇与目前已知的24个Bcc种水平成员能够良好对应，但按照该鉴定标准，此前的基因型IIIA、IIIB应分别隶属于两个独立的种，而基因型I，即*B.c*也应有更细化的种水平分类。不同鉴定方法对Bcc的鉴定水平及方法特点见表3。

表3 不同鉴定方法对 Bcc 的鉴定水平

分类	鉴定方法	原理/靶标	鉴定水平	特点
表型	生化鉴定（API）	碳源/氮源利用，酶促（手动）	属	鉴定结果不稳定，与待测菌株有关。无法区分Bcc近缘菌属/种
	生化鉴定（VITEK II）	碳源/氮源利用，酶促（自动）	属/菌群	数据库有限，鉴定结果不稳定，无法区分Bcc近缘属/种
	生化鉴定（BIOLOG）	碳源/氮源利用，pH，盐浓度，抑菌成分（半自动）	属/菌群	数据库有限，无法区分Bcc近缘属/种
	MALDI-TOF MS	核糖体蛋白图谱	菌群/种	鉴定结果准确性与数据库收录情况相关，对部分Bcc可达到种水平鉴定
基因型	16S rRNA	细菌核糖体小亚基	菌群	对 <i>B.pseudomultivorans</i> 鉴定时需注意
	recA	DNA重组酶	种	大多数的Bcc成员可达到种水平
	hisA	产物参与组氨酸合成	种	大多数的Bcc成员可达到种水平
	Riboprinter	核糖体rRNA-RFLP（自动）	菌株	分型效果良好，但种水平鉴定效果受限于数据库
	MLST/MLSA	多位点序列分型/多位点序列分析	种/菌株	对实验人员要求较高，操作较复杂
	WGS	全基因组水平	种/菌株	成本较高

3 展望

人们对微生物的认识从宏观/微观形态，到代谢特征，再到遗传物质，层层深入，逐渐揭开微生物在漫长进化历史中的角色及彼此之间的关系。鉴定方法也相应经历表型到基因型的递进发展。表型鉴定中的生化鉴定方法是目前制药行业接受度较高、应用也较为广泛的方法之一，传统的生化鉴定不需要复杂的仪器设备，成本低廉，对于鉴定水平

要求不高、鉴定数量较少的使用者而言，性价比较高；自动化的生化鉴定仪的接种、结果读取环节不再依赖手动完成，简化了人员操作，并减少了由此产生的污染和误差，但其成本也相应增加。随着近年来行业对药品微生物相关质量控制认识的深入，无论是鉴定量还是鉴定水平的需求均大大增长，不少制药企业开始建设环境菌库。MALDI-TOF MS作为近年来新兴的微生物鉴定方法以其高通量、快

速以及较高的准确度受到青睐,在临床和制药行业得到应用,但对于某些微生物,其能够达到的鉴定水平有限。基因型鉴定的准确性被公认为优于表型鉴定,特别是当需要进行污染调查或菌株溯源时,根据鉴定水平的需求差异,可选择单一基因序列分析、基因分型或全基因组测序等方法,以达到相应的鉴定目的。不同鉴定方法对Bcc的鉴定水平及方法特点见表3。

Bcc是一类能够引起CF患者和免疫低下人群感染的条件致病菌,对其鉴定/分型需求最初来源于临床流行病学研究。随着对Bcc认识的深入,由于其来源(广泛)、生长特性(能够利用多种单一营养物质、寡养等)、天然多重耐药(某些消毒剂、防腐剂)的特征,使得其易驻留于制药用水系统,且不易被清除,存在着引入终产品的风险,给患者的用药安全带来隐患。Bcc已成为制药行业重点关注的不可接受微生物代表,每年都有产品由于Bcc污染而被召回^[68-69]。值得一提的是,临床和制药行业对于Bcc的鉴定/分型应用需求存在着一定的差异,制药企业通常面对的分离微生物多来自生产环境和人员,种类复杂,但大部分的分离微生物并非致病菌;药品分离微生物的鉴定水平需求与其分离来源相关,有时需要进行分型溯源;药品分离微生物通常处于压力或受损状态,表型特征不典型;制药行业从业人员对于微生物分类学知识的储备仍较为欠缺。因此本研究并未将用于微生物分类学研究的某些常用方法如全细胞蛋白组分分析、脂肪酸分析、AFLP和RFLP等方法对Bcc的鉴定应用进行阐述,而是充分考量药品生产企业在微生物鉴定中的技术需求特点,在保证能够达到相应鉴定水平的前提下,选择了商业化、自动化程度较高的常用表型鉴定、基因型鉴定以及分型溯源分析方法,针对不同的鉴定需求做出相应的鉴定方法建议,为在实际应用中涉及Bcc检验、鉴定及溯源分析的生产企业和检验人员提供参考和借鉴。

参考文献:

- [1] Palleroni N J, B. H. *Pseudomonas Cepacia* Sp. Nov., Nom. Rev[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1981, 31 (4): 479.
- [2] Palleroni N J, Kunisawa R, Contopoulou R, et al. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1973, 23: 333.
- [3] Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, et al. Proposal of *Burkholderia* Gen. Nov. And Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia Cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) Comb. Nov[J]. *Microbiol Immunol*, 1992, 36 (12): 1251.
- [4] Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, et al. Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia Cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia Multivorans* Sp. Nov[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47 (4): 1188.
- [5] Gillis M, Van T V, BARDIN R, et al. Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderiu Vietnarniensis* Sp. Nov. For N,-Fixing Isolates from Rice in Vietnam[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1995, 45 (2): 274.
- [6] Eiko Yabuuchi, Yoshiaki Kawamura, Takayuki Ezaki, et al. *Burkholderia Uboniae* Sp. Nov., L-Arabinose-Assimilating but Different from *Burkholderia Thailandensis* and *Burkholderia Vietnamiensis*[J]. *Microbiol Immunol*, 2000, 44 (4): 307.
- [7] Vandamme P, Mahenthalingame E, Holmes B, et al. Identification and Population Structure of *Burkholderia Stabilis* Sp. Nov. (Formerly *Burkholderia Cepacia* Genomovar IV)[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (3): 1042.
- [8] Coenye T, LiPuma J J, Henry D, et al. *Burkholderia Cepacia* Genomovar VI, a New Member of the *Burkholderia Cepacia* Complex Isolated from Cystic Fibrosis Patients[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 271.
- [9] Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, et al. *Burkholderia Ambifaria* Sp. Nov, a Novel Member of the *Burkholderia Cepacia* Complex Including Biocontrol and Cystic Fibrosis-Related Isolates[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51 (Pt 4): 1481.
- [10] Vandamme P, Henry D, Coenye T, et al. *Burkholderia Anthina* Sp. Nov. And *Burkholderia Pyrrocinia*, Two Additional *Burkholderia Cepacia* Complex Bacteria, May Confound Results of New Molecular Diagnostic Tools[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, 33: 143-149.

- [11] Vandamme P, Holmes B, Coenye T, et al. *Burkholderia Cenocepacia* Sp. Nov.—a New Twist to an Old Story[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154 (2) : 91.
- [12] Vermis K, Coenye T, LiPuma J J, et al. Proposal to Accommodate *Burkholderia Cepasia* Genomovar VI as *Burkholderia Dolosa* Sp. Nov[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54 (Pt 3) : 689.
- [13] Vanlaere E, LiPuma J J, Baldwin A, et al. *Burkholderia Latens* Sp. Nov, *Burkholderia Diffusa* Sp. Nov, *Burkholderia Arboris* Sp. Nov, *Burkholderia Seminalis* Sp. Nov. And *Burkholderia Metallica* Sp. Nov, Novel Species within the *Burkholderia Cepasia* Complex[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58 (7) : 1580.
- [14] Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, et al. Taxon K, A Complex within the *Burkholderia Cepasia* Complex, Comprises at Least Two Novel Species, *Burkholderia Contaminans* Sp. Nov. And *Burkholderia Lata* Sp. Nov[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59 (Pt 1) : 102.
- [15] Peeters C, Zlosnik J E, Spilker T, et al. *Burkholderia Pseudomultivorans* Sp. Nov., a Novel *Burkholderia Cepasia* Complex Species from Human Respiratory Samples and the Rhizosphere[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36 (7) : 483.
- [16] De Smet B, Mayo M, Peeters C, et al. *Burkholderia Stagnalis* Sp. Nov. And *Burkholderia Territorii* Sp. Nov., Two Novel *Burkholderia Cepasia* Complex Species from Environmental and Human Sources[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65 (7) : 2265.
- [17] Ong K S, Aw Y K, Lee L H, et al. *Burkholderia Paludis* Sp. Nov, an Antibiotic-Siderophore Producing Novel *Burkholderia Cepasia* Complex Species, Isolated from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2046.
- [18] Bach E, Sant'Anna F H, Magrich Dos Passos J F, et al. Detection of Misidentifications of Species from the *Burkholderia Cepasia* Complex and Description of a New Member, the Soil Bacterium *Burkholderia Catarinensis* Sp. Nov[J]. *Pathogens and Disease*, 2017, 75 (6) : 1-8.
- [19] Depoorter E, De Canck E, Peeters C, et al. *Burkholderia Cepasia* Complex Taxon K: Where to Split? [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1-17.
- [20] Martina P, Leguizamon M, Prieto C I, et al. *Burkholderia Puraquae* Sp. Nov., a Novel Species of the *Burkholderia Cepasia* Complex Isolated from Hospital Settings and Agricultural Soils[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2018, 68 (1) : 14.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口口腔清洁类产品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法[S]. 2017: 1-10.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口化妆品中洋葱伯克霍尔德菌检验方法[S]. 2017: 1-10.
- [23] Convention U S P. United States Pharmacopieia[S]. 2021: 6454.
- [24] H. G P, A. G P, M. B L, et al. Isolation Medium for the Recovery of *Pseudomonas Cepasia* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 22 (1) : 5-8.
- [25] Welch D F, Muszynski M J, Pai C H, et al. Selective and Differential Medium for Recovery of *Pseudomonas Cepasia* from the Respiratory Tracts of Patients with Cystic Fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25 (9) : 1730.
- [26] Henry D A, Campbell M E, LiPuma J J, et al. Identification of *Burkholderia Cepasia* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis and Use of a Simple New Selective Medium[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35 (3) : 614.
- [27] Henry D, Campbell M, McGimpsey C, et al. Comparison of Isolation Media for Recovery of *Burkholderia Cepasia* Complex from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37 (4) : 1004.
- [28] Vermis K, Vandamme P A, Nelis H J. *Burkholderia Cepasia* Complex Genomovars: Utilization of Carbon Sources, Susceptibility to Antimicrobial Agents and Growth on Selective Media[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95 (6) : 1191.
- [29] Garrity G M, Brenner D J, Krieg N R, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M]. The Second Edition. USA: Springer-Verlag New York Inc, 2005: Vol. 2, 579.
- [30] Kiska D L, Kerr A, Jones M C, et al. Accuracy of Four Commercial Systems for Identification of *Burkholderia Cepasia* and Other Gram-Negative Nonfermenting Bacilli

- Recovered from Patients with Cystic Fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 (4) : 886.
- [31] Shelly D B, Spilker T, Gracely E J, et al. Utility of Commercial Systems for Identification of Burkholderia Cepacia Complex from Cystic Fibrosis Sputum Culture[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (8) : 3112.
- [32] McMenamin J D, Zacccone T M, Coenye T, et al. Misidentification of Burkholderia Cepacia in Us Cystic Fibrosis Treatment Centers: An Analysis of 1,051 Recent Sputum Isolates[J]. *Chest*, 2000, 117 (6) : 1661.
- [33] Henry D A, Mahenthalingam E, Vandamme P, et al. Phenotypic Methods for Determining Genomovar Status of the Burkholderia Cepacia Complex[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 (3) : 1073.
- [34] Fernandez-Olmos A, Garcia-Castillo M, Morosini M I, et al. Maldi-Tof Ms Improves Routine Identification of Non-Fermenting Gram Negative Isolates from Cystic Fibrosis Patients[J]. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2012, 11 (1) : 59-62.
- [35] Vanlaere E, Sergeant K, Dawyndt P, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry of Intact Cells Allows Rapid Identification of Burkholderia Cepacia Complex[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75 (2) : 279-286.
- [36] Lambiase A, Del Pezzo M, Cerbone D, et al. Rapid Identification of Burkholderia Cepacia Complex Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry[J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 92 (2) : 145.
- [37] Wong K S K, Dhaliwal S, Bilawka J, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Ms for the Accurate Identification of Burkholderia Cepacia Complex and Burkholderia Gladioli in the Clinical Microbiology Laboratory[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69 (8) : 1105.
- [38] Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne S K, et al. Dna-Based Diagnostic Approaches for Identification of Burkholderia Cepacia Complex, Burkholderia Vietnamensis, Burkholderia Multivorans, Burkholderia Stabilis, and Burkholderia Cepacia Genomovars I and III[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (9) : 3165.
- [39] 于晓庆, 郝丽君, 刘永光, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌株lyc2的鉴定及对棉苗的防病促生作用[J]. *植物病理学报*, 2007, 37 (4) : 426-432.
- [40] 余萌, 王似锦, 戴翠, 等. Reca基因及核糖体分型技术在洋葱伯克霍尔德菌复合体鉴别与溯源分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39 (8) : 1521.
- [41] 王似锦, 余萌, 胡昌勤, 等. 14株伯克霍尔德菌的鉴定分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44 (10) : 1214.
- [42] 王似锦, 余萌, 杨美琴, 等. 凝胶剂中1株洋葱伯克霍尔德菌的分离、鉴定与生长特性研究[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39 (9) : 1617.
- [43] 周江林, 孔娜, 张琪, 等. 洋葱伯克霍尔德菌复合群部分菌株基于基因组的物种水平重鉴定[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30 (6) : 733.
- [44] Papaleo M C, Russo E, Fondi M, et al. Structural, Evolutionary and Genetic Analysis of the Histidine Biosynthetic "Core" in the Genus Burkholderia[J]. *Gene*, 2009, 448 (1) : 16-28.
- [45] Papaleo M C, Perrin E, Maida I, et al. Identification of Species of the Burkholderia Cepacia Complex by Sequence Analysis of the HisA Gene[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59 : 1163.
- [46] Cesarini S, Bevivino A, Tabacchioni S, et al. RecA Gene Sequence and Multilocus Sequence Typing for Species-Level Resolution of Burkholderia Cepacia Complex Isolates[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49 (5) : 580.
- [47] Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular Genetic Basis of Ribotyping[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21 (2) : 262.
- [48] Fleischmann R D, Adams M D, White O, et al. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus Influenzae Rd[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1995, 269 (5223) : 496-512.
- [49] Laurent F, Carlotti A, Boiron P, et al. Ribotyping: A Tool for Taxonomy and Identification of the Nocardia Asteroides Complex Species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 : 1079.
- [50] Holmes A, Nolan R, Taylor R, et al. An Epidemic of Burkholderia Cepacia Transmitted between Patients with and without Cystic Fibrosis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179 (5) : 1197.

- [51] Sexton M M, Goebel L A, Godfrey A J, et al. Ribotype Analysis of *Pseudomonas Pseudomallei* Isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (2) : 238.
- [52] Sun L, Jiang R Z, Steinbach S, et al. The Emergence of a Highly Transmissible Lineage of Cbl+ *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *Cepacia* Causing Cf Centre Epidemics in North America and Britain[J]. *Nature Medicine*, 1995, 1 (7) : 661.
- [53] Brisse S, Verduin C M, Milatovic D, et al. Distinguishing Species of the *Burkholderia Cepacia* Complex and *Burkholderia Gladioli* by Automated Ribotyping[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (5) : 1876.
- [54] Cunha M V, Leitão J H, Mahenthalingam E, et al. Molecular Analysis of *Burkholderia Cepacia* Complex Isolates from a Portuguese Cystic Fibrosis Center: A 7-Year Study[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 (9) : 4113.
- [55] Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, et al. Species Distribution and Ribotype Diversity of *Burkholderia Cepacia* Complex Isolates from French Patients with Cystic Fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (10) : 4824.
- [56] Coenye T, Spilker T, Martin A, et al. Comparative Assessment of Genotyping Methods for Epidemiologic Study of *Burkholderia Cepacia* Genomovar III[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (9) : 3300.
- [57] Vandamme P, Peeters C. Time to Revisit Polyphasic Taxonomy[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106 (1) : 57-65.
- [58] Gevers D, Dawyndt P, Vandamme P, et al. Stepping Stones Towards a New Prokaryotic Taxonomy[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2006, 361 (1475) : 1911.
- [59] Maiden CJ, Bygraves J A, Fei E, et al. Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95 (6) : 3140.
- [60] Baldwin A, Mahenthalingam E, Thickett K M, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme That Provides Both Species and Strain Differentiation for the *Burkholderia Cepacia* Complex[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (9) : 4665.
- [61] Vermis K, Coenye T, Mahenthalingam E, et al. Evaluation of Species-Specific Reca-Based Pcr Tests for Genomovar Level Identification within the *Burkholderia Cepacia* Complex[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, 51 (11) : 937.
- [62] Spilker T, Baldwin A, Bumford A, et al. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47 (8) : 2607.
- [63] Goris J, Konstantinidis K T, Klappenbach J A, et al. Dna-Dna Hybridization Values and Their Relationship to Whole-Genome Sequence Similarities[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57 (Pt 1) : 81-91.
- [64] Orata F D, Meier-Kolthoff J P, Sauvageau D, et al. Phylogenomic Analysis of the Gammaproteobacterial Methanotrophs (Order *Methylococcales*) Calls for the Reclassification of Members at the Genus and Species Levels[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018 (9) : 1-17.
- [65] Liu Y, Lai Q, Goker M, et al. Genomic Insights into the Taxonomic Status of the *Bacillus Cereus* Group[J]. *Scientific Reports*, 2015 (5) : 1-11.
- [66] Auch A F, von Jan M, Klenk H P, et al. Digital Dna-Dna Hybridization for Microbial Species Delineation by Means of Genome-to-Genome Sequence Comparison[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 2 (1) : 117.
- [67] Jin Y, Zhou J, Zhou J, et al. Genome-Based Classification of *Burkholderia Cepacia* Complex Provides New Insight into Its Taxonomic Status[J]. *Biology Direct*, 2020, 15 (6) : 1-14.
- [68] Parenteral Drug Association. Technical Report No. 67 Exclusion of Objectionable Microorganisms from Nonsterile Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics[R]. USA: PDA, 2014: 1-63.
- [69] Sutton S, Jimenez L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on Fda Considerations of "Objectionable Organisms" [J]. *American Pharmaceutical Review*, 2012, 15 (1) : 42-57.

(收稿日期 2021年12月22日 编辑 邹宇玲)