

DOI:10.16016/j.1000-5404.201602028

## 类鼻疽的实验室诊断及评价

毛旭虎,胡治强 (400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室)

[关键词] 类鼻疽;类鼻疽伯克霍尔德菌;实验室诊断

[中图分类号] R378;R515.904

[文献标志码] A



## Progress of research on laboratory diagnosis of melioidosis

Mao Xuhu, Hu Zhiqiang (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Melioidosis is an emerging, serious infection disease caused by *Burkholderia pseudomallei*, and its morbidity and mortality are high in the epidemic areas. Pathogenic *Burkholderia pseudomallei* can be used as a potential biological weapon and is lethal. Clinical diagnosis of melioidosis is difficult because the disease has no pathognomonic clinical manifestations. Currently, there is no effective treatment method for melioidosis, and long-term antibiotic treatment is needed to prevent disease relapse. Therefore, timely and accurate diagnosis of melioidosis is very important for treatment and prevention of this disease. So far, it has developed a variety of techniques and methods for diagnosis of melioidosis. The review systematically introduced and evaluated laboratory diagnosis and identification methods of melioidosis from the bacteriology, serology, molecular biology and proteomics.

[Key words] melioidosis; *Burkholderia pseudomallei*; laboratory diagnosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471914), the Major Program of "Twelfth Five-year Plan" of Military Logistic Science Research (AWS11J011-04,13LYZ1), the Science Research Foundation of Third Military Medical University (2012XJY03), and the Key Project of Science and Technology Development Plan of Hainan Province (ZDXM2014143). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: maohx2012@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471914);全军后勤科研“十二五”计划重大项目(AWS11J011-04,13LYZ1);第三军医大学科研基金(2012XJY03);海南省重点科技计划项目(ZDXM2014143)

[通信作者] 毛旭虎,男,博士,教授,博士研究生导师。担任国家新药评审专家、国家医疗器械技术审评咨询专家、全军微生物专委会委员、全军生物军控与履约专委会委员、重庆市微生物学会临床微生物及免疫学专委会主任委员、重庆市生物制药专委会副主任委员、重庆市免疫学会理事。美国南加州大学访问学者。主持国家“863”、重大新药创制专项、军队特需药专项、国家自然科学基金等课题12项。申请国家发明专利22项、授权13项;获国家发明二等奖、重庆市技术发明一等奖、军队科技进步二等奖各1项。获总后科技新星、军队院校育才银奖、第三军医大学教学明星、首届中国药学会-赛诺菲安万特青年生物药物奖。在 *Lancet*、*Autophagy*、*J Bacteriol* 等杂志发表SCI论文40余篇,其中以第一通信作者发表15篇。主要从事病原微生物的感染免疫机制及分子诊断方面的研究。E-mail: maohx2012@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160408.1356.003.html>(2016-04-08)

类鼻疽是由类鼻疽伯克霍尔德菌(简称类鼻疽杆菌)引起的一种热带医学疾病,流行分布于热带及亚热带地区,主要集中在东南亚和澳洲北部地区<sup>[1]</sup>。国内类鼻疽疫源地主要分布于海南、广东、广西南部的边缘热带地区。类鼻疽杆菌是一种腐生菌,主要存在于疫区的污水和土壤中。它可通过接触方式经破损的皮肤黏膜、呼吸道和消化道造成感染<sup>[2]</sup>。人的类鼻疽病例分为急性败血型、亚急性型、慢性型和亚临床感染,潜伏期一般为9~21 d,但是也有报道其潜伏期可至数年,最长潜伏感染记录达62年<sup>[3]</sup>。类鼻疽临床症状表现多样,包括亚临床感染、局部的脓肿、重症肺炎和急性败血症型<sup>[1]</sup>,也可能出现其他疾病的类似症状,如肺结核或癌症。目前类鼻疽尚无有效治疗方案,只能长期使用抗生素治疗防止疾病复发<sup>[4]</sup>。由于类鼻疽杆菌强致病性、多重耐药及气溶胶传播的特性,已被美国疾病预防控制中心列为B类生物恐怖制剂和I级病原微生物。

类鼻疽的实验室诊断往往比较困难,不容易从临床标本中分离到其病原菌,即使是分离到也极易误诊<sup>[5]</sup>。临床诊断中,类鼻疽杆菌分离培养时常被误认为是培养污染物或其同属的其他细菌;血清学诊断,如间接血凝试验(indirect hemagglutination assay, IHA)虽然已经得到了广泛的应用,但其敏感性和特异性都不佳;分子生物学方法,如特异引物 PCR、实时定量 PCR 方法虽然提高了检测的准确性和敏感性,但还未能真正应用于临床。类鼻疽的死亡率为 14%~40%,如果不能及时接受有效抗菌药物治疗死亡率可高达 80%以上<sup>[6]</sup>。因此,快速、准确地检测诊断疑似类鼻疽患者使其得到及时有效治疗,对降低类鼻疽临床死亡率有重要意义。目前类鼻疽的实验室诊断方法,主要包括细菌学鉴定、血清学诊断、分子生物学方法以及蛋白质组学等相关技术。

## 1 细菌分离鉴定

类鼻疽杆菌是一种氧化酶阳性、两端钝圆、两极浓染、非发酵革兰阴性杆菌。血平板上生长 24 h 形成光滑湿润、半透明菌落;培养 48 h 后,菌落增大呈灰黄色、表面皱褶、形似“车轮”状,出现明显溶血。麦康凯平板上生长形成分解乳糖的红色菌落。所有生长的菌落有强烈的霉臭味,常被误认为污染物、假单胞菌或同属的其他菌种,例如,泰国伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌。鉴别类鼻疽杆菌、泰国伯克霍尔德菌是指导疑似类鼻疽患者临床治疗的关键,因为超过 99% 类鼻疽病例是由类鼻疽杆菌引起,而泰国伯克霍尔德菌和洋葱伯克霍尔德菌造成的类鼻疽病 < 1%。可通过能否利用 L-阿拉伯糖(arabinose, Ara)进行区分,一般泰国伯克霍尔德菌能够利用 L-阿拉伯糖作为唯一碳源,但类鼻疽杆菌和洋葱伯克霍尔德菌却不能<sup>[5]</sup>。

从污染的环境或临床标本中分离类鼻疽杆菌需要选择培养基,目前流行地区广泛使用的选择培养基是 Ashdown 培养基(ASH),其配制方法是在胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)中添加 4% 甘油,5 mg/L 结晶紫,50 mg/L 中性红与 4 mg/L 庆大霉素<sup>[7]</sup>。类鼻疽杆菌在该培养基上由于中性红指示剂会形成特征性的紫色、表面褶皱菌落。2006 年 Francis 等<sup>[8]</sup>对 Ashdown 培养基进行改良,将庆大霉素浓度由 4 mg/L 提高到 8 mg/L,并用溴甲酚红代替中性红指示剂,培养出的类鼻疽杆菌菌落呈黄色。检测的敏感性也得到轻微的提高,达到 76.7%,而 Ashdown's 培养基敏感性只有 73.3%。在非疫区其他的选择培养基也可用于类鼻疽杆菌的分离。如类鼻疽伯克霍尔德菌选择琼脂(*B. pseudomallei*

selective agar, BPSA)和洋葱伯克霍尔德菌培养基(*B. cepacia* medium, BCM)。2005 年,Peacock 等<sup>[7]</sup>对 ASH、BPSA 和 BCM 进行研究比较发现,3 种培养基灵敏度相似,但用 155 例类鼻疽临床标本进行检测分析时 BPSA 的选择性明显低于 ASH 和 BCM。

目前,从临床标本中分离到类鼻疽杆菌仍是类鼻疽诊断的“金标准”。但实验室诊断仍存在一定困难,尤其在非流行地区。值得注意的是,不同临床标本的病原菌含量差别很大,其中血液含菌量最低(0.1~100 CFU/mL),痰液中最多( $10^2 \sim 10^9$  CFU/mL)<sup>[9]</sup>。分离培养疑似类鼻疽病例的痰、伤口和直肠拭子标本可使用选择性肉汤培养,尿液通过离心浓缩增加细菌量来提高检出率。当分离的细菌菌落形态和类鼻疽杆菌相似时,应当引起高度警觉,尽早报告医生,了解患者病情,获取相关临床资料,避免误诊漏检。此外,细菌抗菌谱也可辅助类鼻疽杆菌诊断,分离的类鼻疽杆菌株通常耐受氨基糖苷类抗生素(如庆大霉素)、多粘菌素,但对阿莫西林/克拉维酸敏感<sup>[10]</sup>。

快速生化分析系统(如:API 20NE 和 VITEK)对类鼻疽杆菌的检测效果也不够理想,即使是阳性培养株,商品化的鉴定系统也不能鉴别类鼻疽杆菌及其相关菌种(如:泰国伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌)<sup>[11]</sup>。有研究显示,Vitek-2 系统对类鼻疽杆菌的鉴定准确率仅有 19%左右,API 20NE、Vitek-1 鉴定系统准确率可达到 80%以上<sup>[5]</sup>,但是检测结果不稳定,会出现明显的地域差别,比如 API 20NE 在泰国鉴定类鼻疽的准确率达 98%~99%,而在澳大利亚准确率在 37%~98%,变化很大。可能是由于不同地区鉴定系统的数据库更新滞后或者不全,造成的检测性能差异<sup>[12-14]</sup>。

## 2 血清学诊断

虽然类鼻疽杆菌分离培养仍是类鼻疽诊断的“金标准”,但从临床标本中分离培养该菌仍需要较长时间,极易延误医院的治疗。因此,在类鼻疽流行地区常将血清学诊断作为初筛方法,辅助诊断。血清学诊断的方法主要有 IHA、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫层析试验(immunochromatographic test, ICT)、乳胶凝集、免疫荧光等。

### 2.1 抗体检测

目前广泛使用的类鼻疽抗体检测方法是 IHA,但实际应用中其敏感性和特异性较低,特别受疫区人群背景抗体的干扰,容易产生假阳性,需要根据当地类鼻疽流行情况确定诊断临界值(cut-off)。在澳大利亚,cut-off 值  $\geq 1:40$ (敏感性 56%);泰国东北部 cut-off 值

1:160(敏感性72%)<sup>[15]</sup>。在类鼻疽急性病程早期往往检测不到血液中的抗体,造成假阴性结果。因此IHA在临床上实用性不强,只适用于流行病学调查或大样本筛查。ELISA检测血清中的IgM和IgG抗体具有较高的敏感性和特异性。全菌、脂多糖(LPS)、胞外多糖(EPS)是ELISA检测中的常用抗原。也有研究报告将类鼻疽杆菌或泰国伯克霍尔德菌的重组鞭毛蛋白及克隆表达类鼻疽杆菌的groEL、maIE基因产物作为抗原,但这些重组蛋白的ELISA临床试验尚未开展<sup>[5]</sup>。2000年,研究人员采用ICT检测121例患者血清中的IgG和IgM抗体。与IHA相比,该法具有更高的敏感性(IgG,100%;IgM,93%),特异性均为95%<sup>[16]</sup>。ICT法简单、快速,不需要专门仪器设备,非专业人员按照说明书即可操作,适合突发事件疾病的快速诊断及病原菌的检测。其他抗体检测方法,如类鼻疽的补体结合试验繁琐、费时,一般只用于动物类鼻疽的研究。间接荧光抗体试验(indirect fluorescent-antibody assays,IFA)对菌量在 $10^3$ CFU/mL的标本(如:脓液、痰液、尿液)十分有效,诊断的敏感性在45%~66%。但IFA需要荧光显微镜和专业技术人员,限制其在流行地区,尤其是经济落后地区的推广应用。

## 2.2 抗原检测

类鼻疽的抗原检测主要有标本或血培养上清的直接抗原检测、胶乳凝集试验、免疫荧光检测以及侧流免疫层析技术(lateral flow immunoassay,LFI)等。虽然,类鼻疽杆菌特异性抗原检测有较高阳性预测值,但针对类鼻疽杆菌脂多糖和特异蛋白组分抗体的试剂还没有商品化,所以在临床实践中很少得到应用。乳胶凝集试验诊断快速(<5 min)、操作简便,是流行地区常用的诊断方法。研究表明使用单克隆抗体的乳胶凝集试验的敏感性和特异性较高<sup>[17]</sup>,如泰国开发的一种针对胞外多糖相对分子质量为 $200 \times 10^3$ 的单克隆抗体乳胶凝集试验,对血培养液的敏感性和特异性分别为95.1%和99.7%<sup>[17]</sup>。免疫荧光试验是利用脂多糖或菌体特异蛋白抗体直接检测标本,但敏感性不高,易产生假阳性结果。Houghton等<sup>[18]</sup>开发的LFI技术,利用荚膜多糖(CPS)特异单克隆抗体检测细菌的荚膜多糖,对77株类鼻疽杆菌和其他36株相近菌株进行鉴定评价,其敏感性和特异性分别达到98.7%和97.2%。

## 3 分子生物学方法

分子生物学方法能缩短诊断时间,敏感性和特异性也均高于常规的血清学诊断。目前已经报道的类鼻疽分子检测主要是基于PCR方法,包括针对16S

rRNA、23S rRNA和Ⅲ型分泌系统的RT-PCR分析及TaqMan比对分析和多种特异性引物PCR<sup>[19-21]</sup>。但都还未广泛应用于临床。

检测的靶基因包括16S rRNA、23S rRNA、LPS、groEL、fliC和Ⅲ型分泌系统(type three secretion system,TTS)基因簇等。其中16S rRNA为基础的PCR方法在临床微生物实验室应用最为广泛。虽然16S rRNA基因测序能够区分鼻疽杆菌和大部分其他的伯克霍尔德菌,但类鼻疽杆菌和泰国伯克霍尔德菌的16S rRNA基因序列差异大约只有1%,因此常会与之混淆。Woo等<sup>[22]</sup>把7株泰国伯克霍尔德菌和6株类鼻疽杆菌的groEL基因扩增测序,发现类鼻疽杆菌和泰国伯克霍尔德菌的groEL核酸序列差异>97.6%。说明groEL基因比16S rRNA具有更强的鉴别力。Merritt等<sup>[23]</sup>对多种PCR方法进行研究比较发现,当使用单一的靶基因进行PCR检测时结果并不可靠,需要结合分离细菌表型及其他分子检测技术共同辅助鉴定诊断。同时,随着近年测序速度加快、成本降低以及分析软件的发展,多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)也逐渐应用于类鼻疽杆菌的诊断鉴定。MLST是通过PCR扩增细菌7个保守基因(housekeeping gene)约450 bp的核心片段并测定其序列,使用软件分析数据实现其诊断鉴定并分析菌株变异<sup>[24]</sup>。MLST操作简单,具有很高的分辨能力,结果能快速得到并且便于不同实验室间菌株分型的比较。

## 4 蛋白质组学方法

### 4.1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是一种新型的应用于微生物快速鉴定的革命性技术,不同细菌使用MALDI-TOF-MS检测产生特异性的指纹图谱,建立检测细菌的质谱图库,再将待检测细菌的质谱图与已有的质谱图库进行比较,即可对细菌进行鉴定。该技术具有快速、准确、高度可重复性的特点,已经越来越多地应用到临床实验室,对提高类鼻疽的快速鉴定有重要意义。2012年,Inglis等<sup>[25]</sup>使用分离鉴定的43株类鼻疽杆菌建立类鼻疽杆菌参考质谱图库,并将该质谱图库用于临床阳性培养患者的类鼻疽诊断。但目前由于商业化的质谱图库不全,容易导致鉴定错误,因此今后发展MALDI-TOF-MS的关键是完善不同流行地区的类鼻疽质谱图库及其相关的数据支持<sup>[26]</sup>。

### 4.2 代谢组学分析新型生物标记物鉴定

代谢组学是通过测定生物系统如:细胞、组织、器

官各种代谢途径中所有小分子组成,描绘其动态变化规律,建立系统代谢图谱,依赖模式识别技术对得到的数据进行分析,发现每个生物系统的特异代谢物靶标。代谢组学分析逐渐成为微生物学和传染病研究中的一重要工具,尤其对实验室病原菌的检测具有很大潜力。一些初期研究表明类鼻疽患者与其他原因造成败血症患者的体液代谢组学分析是存在差异的。Lau等<sup>[27]</sup>对类鼻疽杆菌培养的上清液进行代谢分析,发现多种新型特异生物标志物,包括4-甲基-5-噻唑乙醇(4-Methyl-5-thiazoleethanol)和2种4肽化合物。通过细菌分离培养和直接标本检测的提高,构建功能完善的类鼻疽杆菌的生物化学数据库和代谢物谱数据库,用于筛选类鼻疽杆菌特异生物标志物。代谢组学分析将来有可能成为一种快速特异性类鼻疽检测诊断方法。

## 5 展望

类鼻疽作为一种新兴传染病,在流行地区仍会造成相当高的发病率和死亡率。并且在许多非流行地区也分离到类鼻疽杆菌并且出现越来越多的病例报道,因此有学者认为类鼻疽是一种正在扩散的传染病<sup>[28]</sup>。类鼻疽感染后临床症状多样化,实验室诊断又需要多种专业的检测,一般基层微生物实验室难以达到要求。因此,在非流行地区,经常发生初次感染后仍不能确诊或者诊断延迟的情况。此外类鼻疽杆菌具有多重耐药性,常导致经验性用药治疗无效。所以非流行地区以及基层的临床医生、卫生人员等,了解熟悉类鼻疽杆菌的诊断鉴定方法,对类鼻疽的诊治和预防控制具有重要意义。

类鼻疽作为潜在的生物恐怖剂及其日益严重的危害,已经成为世界各国生物安全应急处置的重要内容。特别是类鼻疽的检测诊断和防治研究备受关注。尽管在细菌快速鉴定的研究中取得了一些进展,但目前类鼻疽的诊断方法仍不理想,尤其对阴性培养病例,仍需要进一步鉴定。分子生物学方法的发展大大提高了对临床标本中类鼻疽杆菌鉴定的准确性,但PCR扩增和基因测序在一些基层地区能仍很难实现,此外引物结合位点的随机突变也可能使检测结果变得不可靠,应用于环境和临床标本的特异PCR技术,其诊断的敏感性还有待评估;现有的血清学检测方法的敏感性和特异性低,特别在类鼻疽的流行地区,受到人群背景抗体的干扰,发展和推广受到限制;近年,随着蛋白质组学的发展和完善为类鼻疽的检测诊断提供了新的方法和思路,如上述提到的MALDI-TOF-MS技术和代谢组学分析方法,通过细菌培养和直接标本检测,构建完善的

类鼻疽杆菌质谱图库及代谢物数据库,筛选用于鉴定类鼻疽杆菌的特异生物标志物,都将有助于指导和辅助类鼻疽的快速鉴定诊断。

## 参考文献:

- [1] Cheng A C, Currie B J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 383 - 416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
- [2] Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Amornchai P, et al. Effectiveness of a simplified method for isolation of *Burkholderia pseudomallei* from soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(3): 876 - 877. DOI: 10.1128/AEM.07039-11
- [3] Ngauy V, Lemeshev Y, Sadkowski L, et al. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 970 - 972. DOI: 10.1128/JCM.43.2.970-972.2005
- [4] Hatcher C L, Muruato L A, Torres A G. Recent Advances in *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei* Research [J]. Curr Trop Med Rep, 2015, 2(2): 62 - 69. DOI: 10.1007/s40475-015-0042-2
- [5] Lau S K, Sridhar S, Ho C C, et al. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(6): 742 - 751. DOI: 10.1177/1535370215583801
- [6] Hoffmaster A R, AuCoin D, Baccam P, et al. Melioidosis diagnostic workshop, 2013 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(2). DOI: 10.3201/eid2102.141045
- [7] Peacock S J, Chieng G, Cheng A C, et al. Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5359 - 5361. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5359-5361.2005
- [8] Francis A, Aiyar S, Yean C Y, et al. An improved selective and differential medium for the isolation of *Burkholderia pseudomallei* from clinical specimens [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 55(2): 95 - 99. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.11.008
- [9] Wongsuvan G, Limmathurotsakul D, Wannapasni S, et al. Lack of correlation of *Burkholderia pseudomallei* quantities in blood, urine, sputum and pus [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2009, 40(4): 781 - 784.
- [10] Podin Y, Sarovich D S, Price E P, et al. *Burkholderia pseudomallei* isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1): 162 -

166. DOI: 10.1128/AAC.01842-13
- [11] Weissert C, Dollenmaier G, Rafeiner P, *et al.* *Burkholderia pseudomallei* misidentified by automated system[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(11): 1799 – 1801. DOI: 10.3201/eid1511.081719
- [12] Amornchai P, Chierakul W, Wuthiekanun V, *et al.* Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3774 – 3776. DOI: 10.1128/JCM.00935-07
- [13] Kiratisin P, Santanirand P, Chantratita N, *et al.* Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59(3): 277 – 281. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.013
- [14] Lowe P, Engler C, Norton R. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4625 – 4627.
- [15] Cheng A C, O'brien M, Freeman K, *et al.* Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia[J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 74(2): 330 – 334.
- [16] Cuzzubbo A J, Chenthamarakshan V, Vadivelu J, *et al.* Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M and immunoglobulin G immunochromatographic test for diagnosis of melioidosis infection[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4): 1670 – 1671.
- [17] Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, *et al.* Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia [J]. J Med Microbiol, 2000, 49(12): 1075 – 1078. DOI: 10.1099/0022-1317-49-12-1075
- [18] Houghton R L, Reed D E, Hubbard M A, *et al.* Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(3): e2727. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002727
- [19] Kaestli M, Richardson L J, Colman R E, *et al.* Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 2059 – 2062. DOI: 10.1128/JCM.06737-11
- [20] Supaprom C, Wang D, Leelayuwat C, *et al.* Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2894 – 2901. DOI: 10.1128/JCM.00291-07
- [21] Thibault F M, Valade E, Vidal D R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5871 – 5874. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5871-5874.2004
- [22] Woo P C, Lau S K, Teng J L, *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. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x
- [23] Merritt A, Inglis T J, Chidlow G, *et al.* PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2006, 48(5): 239 – 244.
- [24] Fang Y, Zhu P, Li Q, *et al.* Multilocus sequence typing of 102 *Burkholderia pseudomallei* strains isolated from China [J]. Epidemiol Infect, 2016, 8: 1 – 7. DOI: 10.1017/S0950268815003052
- [25] Inglis T J, Healy P E, Fremlin L J, *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis for rapid confirmation of *Burkholderia pseudomallei* in septicemic melioidosis[J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 86(6): 1039 – 1042. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0454
- [26] Lau S K, Tang B S, Curreem S O, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*; importance of expanding databases with pathogens endemic to different localities[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3142 – 3143. DOI: 10.1128/JCM.01349-12
- [27] Lau S K, Lam C W, Curreem S O, *et al.* Metabolomic profiling of *Burkholderia pseudomallei* using UHPLC-ESI-Q-TOF-MS reveals specific biomarkers including 4-methyl-5-thiazoleethanol and unique thiamine degradation pathway [J]. Cell Biosci, 2015, 5: 26. DOI: 10.1186/s13578-015-0018-x
- [28] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315 – 1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013

(收稿:2016-02-12;修回:2016-03-11)

(编辑 王 红)