

- [2] Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in 2 hosp ital mor2 tal ity of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood [J]. Clin Chem Lab Med, 2004, 42(8): 933-938.
- [3] 陈海生. 外周血有核红细胞自动检测应用研究[J]. 现代医院, 2011, 11(6): 69-70.
- [4] 荆艳书. 末梢血中出现有核红细胞的临床意义[J]. 中国实用医药, 2006, 1(5): 58.
- [5] 邓家栋. 临床血液学[M]. 上海: 上海科学出版社, 2001: 1171.
- [6] 吴登蜀, 曹志红, 谢兆霞. 外周血伴幼稚红细胞的再生障碍性贫血 54 例临床分析[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(8): 1105.

- [7] 顾中华, 王珏, 毛玉文. 血涂片中出现有核红细胞的临床意义[J]. 江南大学学报: 自然科学版, 2005, 4(1): 109-110.
- [8] 李泳, 许蕾. 重视血涂片细胞形态学检查[J]. 检验医学, 2007, 22(1): 97-98.
- [9] 卢兴国, 从玉隆. 应重视提升传统血液形态学检验水平[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 481-482.
- [10] 刘杰, 杨晓春, 郝维敏. 外周血涂片检出幼稚红细胞临床意义探讨[J]. 淮海医药, 2008, 26(4): 302-303.

(收稿日期: 2013-04-01)

• 经验交流 •

糖尿病患者右小腿脓肿分枝杆菌感染菌种鉴定分析

曾 平, 邹自英[#], 吴艾霖[#], 朱 冰, 刘 媛, 熊 杰[△]
(成都军区总医院检验科, 四川成都 610083)

摘 要:目的 对糖尿病患者右小腿感染病原菌进行菌种鉴定分析。方法 对病原菌进行温度生长试验(28 ℃、37 ℃及 45 ℃)、革兰染色和抗酸染色, 采用 16S rDNA 序列分析技术结合生化试验进行菌种鉴定。结果 病原菌能在麦康凯琼脂 28 ℃及 37 ℃下生长, 而 45 ℃不生长。经 16S rDNA 序列分析技术鉴定为龟/脓肿分枝杆菌, 同源度 98.5%。生化试验结果为枸橼酸盐(28 ℃)阴性, 28 ℃ 5% NaCl 培养基生长试验阳性, 病原菌鉴定为脓肿分枝杆菌。结论 脓肿分枝杆菌是引起糖尿病患者右小腿感染的病原菌, 16S rDNA 序列分析技术结合生化实验可用于 NTM 的菌种鉴定。

关键词: 糖尿病; 非结核分枝杆菌; 快速生长分枝杆菌; 脓肿分枝杆菌; 16S rDNA 序列分析; 皮肤感染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.055

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)19-2607-03

作者从 1 例糖尿病患者右小腿皮损组织两次分离出 1 株非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM), 经 16S rDNA 序列分析技术结合生物学试验鉴定为脓肿分枝杆菌, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 女性, 69 岁, 右小腿红肿、结节、溃疡伴疼痛 6 月, 加重 1 月。6 月前右下肢胫前被竹签刺伤, 随后逐渐出现皮肤红肿、化脓、破溃, 当地诊所予以抗感染治疗无缓解。3 个月前确诊为糖尿病, 以胰岛素控制血糖, 局部换药, 伤口结痂。约 2 个月前, 右小腿、足部红肿, 出现数个约 2.0 cm×2.0 cm 大小皮下结节, 部分破溃, 表面结痂伴脓血性分泌物渗出, 触痛明显, 无明显瘙痒。因“糖尿病、糖尿病足”入本院内分泌科给予“抗感染、降糖、活血化瘀、局部换药”等对症治疗半月后, 糖尿病好转出院。出院时右小腿肿胀消退, 结节仍存在, 周围呈暗红色斑, 溃疡结痂, 无明显渗出糜烂。1 个月前右小腿结节逐渐增多, 部分结节隆起, 呈暗红色, 脓血性分泌物渗出, 触痛明显; 半月前, 右膝盖附近新出现 3 个蚕豆大小暗红色丘疹、结节, 触之略疼痛。门诊以“孢子丝菌病, 糖尿病”收治皮肤科。患者右小腿感染病灶见图 1。

1.2 方法 对病原菌进行温度生长试验(28 ℃、37 ℃及 45 ℃)、革兰染色和抗酸染色, 采用 16S rDNA 序列分析技术结合生化试验进行菌种鉴定。

2 结 果

2.2 实验室常规检验

2.2.1 异常生化指标 葡萄糖 13.33 mmol/L, 总胆红素 38.1 μmol/L, 直接胆红素 10.0 μmol/L, 间接胆红素 28.1 μmol/L, γ-谷氨酰转肽酶 75.7 IU/L, 乳酸脱氢酶 245.3 IU/L, 超敏 C 反应蛋白 9.88 mg/L。空腹葡萄糖 8.12 mmol/L, 糖化血红蛋白 10.8%。

2.2.2 其他检验 HBsAg(+), HBeAb 阳性(+), HBcAb 阳

性(+). HBV-DNA 载量为 2.4×10^4 copies/mL。皮损分泌物及组织 TB-DNA 检测均为阴性。其余检验结果未见异常。

2.3 放射影像学检查

2.3.1 胸部 X 光片提示 双肺纹理稍增多。

2.3.2 右小腿平片提示 (1) 右侧腓骨中段后侧软组织区小片影, 考虑体外异物或其他; (2) 右侧胫腓骨未见骨及关节病变。

2.3.3 双侧下肢血管 MRA 提示 (1) 左侧胫前动脉、腓动脉、胫后动脉狭窄, 以腓动脉为主; (2) 右侧腓动脉远端狭窄; (3) 双侧腓窝、小腿多发团块造影剂染色以右侧为主。

2.4 超声影像学检查

2.4.1 腹部彩超提示 双肾小结石或小结晶, 肝胆脾胰及双侧输尿管未见异常回声。

2.4.2 双下肢血管彩超提示 (1) 双下肢粥样硬化斑形成。(2) 右小腿肌间静脉广泛血栓形成。

2.5 病理学检查

2.5.1 皮肤组织活检 右小腿皮下组织慢性化脓性炎, 大量急性慢性炎细胞浸润, 以小淋巴细胞为主, 局灶小脓肿形成, 以皮肤附件周围较为明显。

2.5.2 免疫标志 CD20, CD78a, CD138, CD3, CD56, TIA-1, GrB, Ki67, MUM1, PAX-5 均为阳性(+).

2.5.3 特殊染色 抗酸染色阳性; PAS(-)。

2.6 微生物学检验

2.6.1 常规细菌学检验 多次分泌物真菌 10% KOH 直接镜检及真菌培养阴性。多次革兰染色镜检未查见真菌。2 月 8 日分泌物涂片革兰染色未查见细菌及真菌。皮损分泌物普通细菌培养 48 h 无细菌生长。2 月 4 日送检皮损组织需氧培养 10 d 报告快速分枝杆菌生长。培养物革兰染色查见革兰氏阳性杆菌, 见图 2; 萼-纳抗酸染色查见抗酸杆菌, V 形或分支状排列, 见图 3。触酶(+), 该菌于 28 ℃在血琼脂、麦康凯、沙保

弱、营养琼脂培养基上 5 d 时生长良好, 28 ℃ 时在营养肉汤培养 3~5 d 有絮状沉淀。2 月 4 日和 2 月 17 日两次送检皮损组织均培养出快速生长分枝杆菌。



图 1 患者右小腿感染灶

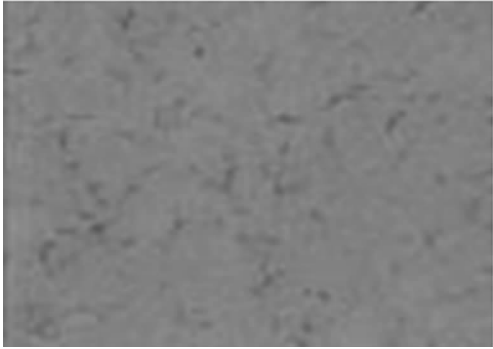


图 2 革兰染色(×1 000 倍)

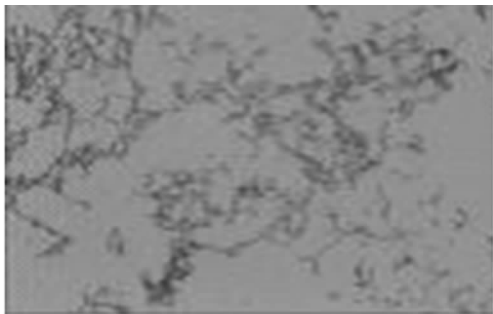


图 3 抗酸染色(×1 000 倍)

2.6.2 病原菌 16S rDNA 序列分析 (1)采用通用引物 27F 和 1492R, 引物序列分别为: 27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。(2)扩增出 979 bp 和 817 bp 片段产物, 拼接序列为 1 468 bp 片段。(3)16S rDNA 序列比对分析: 将菌株送北京某公司采用 16S rDNA 序列分析技术进行菌种鉴定, 结果为龟/脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae/abscessus*, 同源度 98.5%)。将拼接序列分别输入 Genbank 数据库和 RIDOM 数据库进行比对分析结果显示均无法鉴别龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)和脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)。

2.6.3 补充生化试验 枸橼酸盐利用试验(28 ℃)阴性, 28 ℃ 5% NaCl 培养基生长试验阳性, 结合序列分析结果最终鉴定病原菌为脓肿分枝杆菌。

3 讨 论

NTM 是指除结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌外的其他分枝杆菌^[1]。本文患者为老年女性, 糖尿病诊断明确, 当出现皮肤伤口迁延不愈时, 内分泌科医生常误认为是糖尿病本身并发症所致, 而造成漏诊。由于只是针对糖尿病并发症进行对症处理, 也进行了抗感染治疗, 但疗效不佳。当患者再次就诊皮肤科时, 由于患者右小腿皮肤病灶与孢子丝菌临床表现相似, 初诊为孢子丝菌病, 并多次取皮损分泌物送微生物室进行真菌感染病原学相关检查, 结果均为阴性。由于临床误判和实验室流程原因, 真菌培养只接种沙保弱培养基(28 ℃), 在第 5 天时发现沙保弱培养基上有细小菌落生长, 涂片镜检查见

革兰弱阳性杆菌, 有分支状排列, 再涂片行抗酸染色查见抗酸杆菌, 延长脱色时间仍为抗酸阳性, 据此可以排除奴卡菌(延长脱色时间抗酸染色阴性)感染。经查阅相关资料实验室初步考虑为 NTM 中的 RGM, 依据是 TB-DNA 检测阴性, 该菌 28 ℃ 和 37 ℃ 在普通培养基上均可生长, 而 45 ℃ 未见生长。28 ℃ 能在麦康凯培养基生长, 与临床联系后初步报告“RGM 生长”^[2]。

由于实验室未开展分枝杆菌的常规培养, 为进一步明确菌种鉴定, 作者将该菌纯培养外送北京某公司进行 16S rDNA 序列分析技术鉴定, 结果为龟/脓肿分枝杆菌(同源度 98.5%)。16S rDNA 序列分析已成为鉴定分枝杆菌的金标准, 但是最好选择两个或两个以上数据库进行横向序列比对分析, 如果结果不一致, 再进一步分析^[3]。作者将所得序列分别进入 Genbank 和 RIDOM 数据库进行横向比较分析, 发现不能将龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌完全区分开, 文献建议采用生化试验鉴别^[3]。作者补充试验结果是 28 ℃ 枸橼酸盐利用试验阴性和 5% NaCl 培养基生长试验阳性, 病原菌最终确定为脓肿分枝杆菌。也可选择病原菌其他的靶基因如 16~23 S rRNA、IS 6110、rpo B、hsp 65 等将其鉴定到种或亚种^[4-6]。

关于 RGM 的体外药敏试验, 本实验室尚未常规开展。国内有学者采用 BACTEC 绝对浓度间接法对 180 株 RGM 进行 12 种药物体外敏感试验, 结果显示 RGM 仅对克拉霉素、阿米卡星及乙胺丁醇等少数药物敏感性较好^[7]。2007 年美国胸科协会(ATS)和美国感染性疾病协会(IDSA)发布了《非结核分枝杆菌病的诊断、治疗和预防》正式报告, 建议对 RGM(偶然分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和龟分枝杆菌)的常规药敏试验应包括阿米卡星、伊米配能(只限偶然分枝杆菌)、多西环素、氟喹酮、磺胺或复方磺胺甲恶唑、头孢西汀、克拉霉素、利奈唑胺和妥布霉素(只限龟分枝杆菌)^[8], 也可以为菌种准确鉴定提供一定依据, 可能是我国 RGM 药物敏感试验发展的方向。

脓肿分枝杆菌对常见抗结核药物多重耐药, 采用局部手术清创联合以克拉霉素为基础的多药治疗 RGM 感染预后较好^[5,7-8]。本院对该患者采用复方磺胺甲恶唑联合亚胺培南和局部清创引流敷药对症处理相结合, 治疗 1 周后患者渗出物明显减少, 肿胀明显消退, 溃疡部分结痂。出院后继续口服复方磺胺甲恶唑, 门诊随访 1 年无复发。

该患者由于患糖尿病多年, 抵抗力下降, 属于 NTM 易感人群。而 RGM 常广泛分布于自然界土壤等环境中, 当患者遭到意外创伤(右下肢竹签刺伤)后容易发生接触感染, 加上患者久居偏僻农村, 感染 RGM 后并未及时就医, 只是针对糖尿病进行治疗而造成 RGM 感染治疗延误。另一方面, 临床可能由于经验不足, 未仔细询问患者外伤病史, 未考虑到 NTM 感染可能, 判断失误客观上造成漏诊和误诊。

国内有报道脓肿分枝杆菌引起左耳部皮肤及关节感染, 均为散发病例, 应引起临床上足够认识和重视^[9-10]。同时, 微生物实验室应加强 NTM 尤其是 RGM 的检测, 同时采用 16S rDNA 序列分析结合部分生化试验的方法鉴定菌种, 为临床诊治提供可靠的病原学依据。

参考文献

- [1] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理指南[J]. 中华结核与呼吸杂志, 2000, 23(11): 650-653.
- [2] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港: 黄河文化出版社, 1992: 258-260.
- [3] 刘朝军, 沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌分析中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 776.
- [4] 赵建宏, 李雅静, 温海楠, 等. 非结核分枝杆菌感染的分子诊断研究进展[J]. 检验医学, 2012, 27(3): 155-158.

[5] Villanueva A, Calderon RV, Vargas BA, et al. Report on an outbreak of post-injection abscesses due to Mycobacterium abscessus, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction[J]. Clin Infect Dis, 1997, 24: 1147-1153.

[6] Ly YB, Zhang YY, Huang MX, et al. Rapid identification and differentiation of the species of the Mycobacterium chelonae/abscessus complex by hsp65 and rpoB PCR-RFLP[J]. Chin J Zoon, 2012, 28(7): 645-652.

[7] 陈华, 陈品儒, 肖芃. IV 群非结核分枝杆菌 180 株分布及耐药性分析[J]. 广东医学, 2011, 32(11): 1433-1434.

[8] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(4): 367-416.

[9] 陈雪, 赵亭, 孙秋宁, 等. 脓肿分枝杆菌性皮肤溃疡[J]. 临床皮肤科杂志, 2004, 33(4): 339-340.

[10] 郭玲, 叶丽艳, 赵强, 等. 龟脓肿分枝杆菌引起关节感染 1 例[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(9): 1798.

(收稿日期: 2013-05-08)

• 经验交流 •

D-二聚体测定在中老年人体检中的临床价值

戴国奎

(广州市干部疗养院检验科, 广东广州 510530)

摘要:目的 探讨 D-二聚体测定在中老年体检人群中对血栓疾病的临床监察价值。方法 运用法国 MINI-VIDAS 全自动免疫荧光分析仪测定该院体检的中老年人群血浆 D-二聚体浓度, 按年龄结构分组, 其中, 40~50 岁为 A 组, >50~60 岁为 B 组, >60 岁为 C 组, 每组 100 例, 分别统计各组数据; 对 D-二聚体水平超过同组平均水平 3 倍标准差的患者再进行深部静脉彩色多普勒超声检查, 并将超声检测未发现静脉血栓栓塞症(VET)人群纳入追踪随访对象并持续 1 年, 以评价 D-二聚体测定对 VET 的监控价值。**结果** A、B、C 组 D-二聚体测定结果分别为 $(446 \pm 21.4) \mu\text{g/L}$ 、 $(563 \pm 64.7) \mu\text{g/L}$ 、 $(641 \pm 59.6) \mu\text{g/L}$, 三组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。D-二聚体水平超过同组平均水平 3 倍标准差的患者进行深部静脉彩色多普勒超声检查, 发现此类患者一年内发生 VET 的比率分别为, A 组 15.8%(3/19), B 组 23.1%(6/26), C 组 34.2%(13/38)。**结论** D-二聚体随年龄增高有增加趋势, 可以作为中老年人常规体检项目。

关键词: D-二聚体; 静脉血栓; 多普勒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.056

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)19-2609-02

D-二聚体是纤维蛋白单体经活化因子Ⅻ交联后, 再经纤溶酶水解所产生的一种特异性降解产物, 是纤溶过程中的特异性标记物, 近年来的研究证实, D-二聚体不仅与众多疾病相关联, 它还与深部静脉栓塞直接相关, 尤其是 D-二聚体对深部静脉栓塞拥有较高的阴性预测值, 更是引起临床的浓厚兴趣。1971 年, Wilson 等首先将纤维蛋白降解产物用于诊断肺静脉栓塞, 开启了运用纤维蛋白降解产物诊断深部静脉栓塞的先河。到 1983 年, Rylatt 较为详细地阐述了运用 D-二聚体单克隆抗体在临床观测凝血和纤溶过程中的诊断效能, 提出了可以利用测定 D-二聚体含量来对静脉血栓进行排除诊断^[1-5]。为发现中老年人体检人群中深部静脉栓塞潜在患者, 作者对 2011 年 1 月至 2012 年 12 月来本院体检的中老年人群进行了血浆 D-二聚体含量测定, 以期对发现中老年人中早期静脉血栓患者提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有实验对象均选自 2011 年 1 月至 2012 年 12 月到本院体检的中老年人群, 其中 40~50 岁为 A 组, >50~60 岁为 B 组, >60 岁为 C 组, 每组 100 例。所有实验对象均经过本院医学伦理委员会讨论并符合伦理道德标准, 且将检测方法 & 检测项目之目的意义明确告知参与体检人群并得到体检者本人认可。

1.2 实验入选及排除标准 无明显身体不适且近两周内未服用过抗凝药物者为入选对象; 有明显身体行动障碍、近两周内有服用药物者、临床诊断为静脉血栓患者均为排除对象。

1.3 方法 为保障实验结果的可比性及实验条件的相对一致性, 规定所有入选对象均在早上空腹、取坐位抽血 1.8 mL 静脉血并枸橼酸钠抗凝, 在 1 h 内以 3 000 r/min 转速之离心力离心 10 min 分离血浆待检, 总体实验于 3 h 内完成, 若不能按

规定时间完成, 则将标本置于 -40℃ 冷冻保存, 保存时间不能超过 1 周, 注意标本存放温度及不得反复冻融。检测仪器采用法国梅里埃生物技术公司生产的 MINI-VIDAS 全自动荧光免疫分析仪, 试剂采用原厂配套产品, 为保障结果的准确性, 每次检验均应设置高低两个质控品对实验进行全程监控, 具体实验、操作方法及注意事项见说明书。对 D-二聚体水平超过同组平均水平 3 倍标准差的患者再进行深部静脉彩色多普勒超声检查。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 D-二聚体水平比较 A、B、C 组 D-二聚体测定结果分别为 $(446 \pm 21.4) \mu\text{g/L}$ 、 $(563 \pm 64.7) \mu\text{g/L}$ 、 $(641 \pm 59.6) \mu\text{g/L}$, 三组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 D-二聚体对静脉血栓栓塞症(VET)的诊断价值 对 D-二聚体水平超过同组平均水平 3 倍标准差的患者再进行深部静脉彩色多普勒超声检查。发现此类患者一年内发生 VET 的比率分别为, A 组 15.8%(3/19), B 组 23.1%(6/26), C 组 34.2%(13/38)。

3 讨论

D-二聚体自从运用临床以来, 就被发现了与多种临床疾病相关联, 诸如心肌梗死、心绞痛、高血压、冠心病和各种创伤等。D-二聚体对 VET 的较高阴性排除值, 更是引起了研究者的浓厚兴趣, 其灵敏、可靠、简单、快捷、低创伤性的检测手段易于为患者接受, D-二聚体对 VET 的诊断及治疗至关重要, 被认为是排除 VTE 的首选检测指标^[6-7]。本研究中发现, 不同年龄段 D-二聚体含量明显不同, 年龄越大, 血浆 D-二聚体含量越高,