

• 检验技术与方法 •

罕见豚鼠耳炎奴卡菌的鉴定及其药物敏感性分析

张 薇, 彭国钧, 刘 佳, 胡红焱, 梁 慧[△]

(武警总医院检验科, 北京 100039)

摘要:目的 探讨罕见豚鼠耳炎奴卡菌的鉴定方法并评价其药物敏感性。方法 采用形态、生理生化表型鉴定与 16S rRNA 序列分析相结合的方法鉴定菌株, 使用微量肉汤法检测其药物敏感性。结果 临床分离的奴卡菌被鉴定为豚鼠耳炎奴卡菌, 其对哌拉西林、红霉素、头孢他啶、头孢哌酮、庆大霉素、头孢西丁、哌拉西林/他唑巴坦耐药, 万古霉素、左氧氟沙星、亚胺培南、依替沙星、环丙沙星、阿米卡星、复方磺胺甲异噁唑敏感。结论 16S rRNA 基因序列分析法可用于鉴定豚鼠耳炎奴卡菌, 磺胺类药物有效。

关键词: 16S rRNA; 序列分析; 豚鼠耳炎奴卡菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)10-1320-03

Identification of rare *Nocardia otitidiscaviarum* and its drug sensitivity analysis

Zhang Wei, Peng Guojun, Liu Jia, Hu Hongyan, Liang Hui[△]

(Department of Clinical Laboratory, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To study the identification of rare *Nocardia otitidiscaviarum* and its drug sensitivity. **Methods** Morphological, physiological and biochemical phenotype identification methods combined with 16S rRNA sequence analysis were employed to identified the bacteria strains. Broth method was used to detect their drug sensitivity. **Results** The clinically isolated *Nocardia* strain was identified as *Nocardia otitidiscaviarum* which was resistant to piperacillin, erythromycin, ceftazidime, cefoperazone, gentamicin, cefoxitin, piperacillin/tazobactam, and was sensitive to vancomycin, levofloxacin, imipenem, etimicin, ciprofloxacin, amikacin, sulfamethoxazole. **Conclusion** 16S rRNA gene sequence analysis can be used to identify *Nocardia otitidiscaviarum*, and sulfa drugs shows good therapeutic effect.

Key words: 16S rRNA; sequence analysis; *Nocardia otitidiscaviarum*

奴卡菌是一类广泛分布于土壤的需氧性放线菌, 可引起人类急性或慢性奴卡菌病, 属于多源性感染^[1]。临床感染患者标本中分离到的奴卡菌最常见的是星形奴卡菌和巴西奴卡菌, 而罕见豚鼠耳炎奴卡菌, 国内、外也罕见报道^[2]。因其生化反应不典型, 临床少见, 鉴定比较困难, 必须结合 16S rRNA 基因序列进行分析。现将本院 1 例豚鼠耳炎奴卡菌感染病例临床资料、微生物特征及 16S rRNA 序列报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者, 女, 62 岁, 辽宁省人; 2012 年 3 月因“腰部疼痛伴右下肢疼痛 6 月余”就诊于本院, 手术诊断“腰椎间盘突出症”, 接受手术治疗 15 d 后康复出院。出院后 2 周开始发热, 体温 37.8℃, 以午后发热为主, 手术创口出现炎性渗出, 于当地医院抗感染治疗(第 3 代头孢菌素)未见好转。于 7 月 9 日转入本院治疗。既往史: 高血压 20 余年, 口服降压药治疗, 血压控制良好。入院时体检: 体温 37℃, 血压 120 mm Hg/70 mm Hg。实验室检查(7 月 11 日), WBC: 10.62×10⁹/L, 中性粒细胞百分率: 82.3%, 淋巴细胞百分率: 13.2%, C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP): 33 mg/L, 红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR): 53 mm/L。伤口部位取分泌物送微生物实验室检查, 同时进行 3 d 抗感染治疗(亚胺培南), 未见明显好转。

1.2 分离与鉴定 参照《临床检验操作规程》第 3 版中的细菌鉴定方法, 取伤口分泌物接种血平板和麦康凯培养基, 35℃培

养 24 h 后观察菌落。根据 2011 年美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准, 用微量肉汤稀释法检测其药物敏感性。对菌株各项生理、生化项目进行手工测定, 每项测试均重复 2 次, 并设置对照, 部分测试项目需延长培养时间至 5 d, 同时采用细菌微量生化鉴定管对待测菌株进行各项生化指标的测定, 以此补充并验证手工鉴定的准确性。

1.3 核酸提取 取 50 μL 1% Chelex-100 树脂悬浮液, 加入 1.5 mL 离心管, 挑取试验菌单个菌落, 置入离心管混匀, 制成菌悬液。100℃加热 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即为试验菌基因组 DNA。

1.4 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的扩增与纯化 将上述制备的试验菌基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 采用 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增。引物如下, 16S-F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 16S-R: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3', 扩增片段为 1 500 bp。反应体系: 无菌超纯水(15 μL), 10×LA PCR Buffer II(2.5 μL), dNTP Mixture(各 1.25 mmol/L)4 μL, 16S rRNA 引物 F(10 μmol/L)及引物 R(10 μmol/L)各 1 μL, TaKaRa LA Taq(5 U/μL)0.25 μL, 基因组 DNA 2 μL。循环参数: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 2 min, 30 个循环; 72℃补充延伸 5 min。

1.5 琼脂糖凝胶电泳 扩增反应完毕后, 行琼脂糖凝胶电泳,

通过凝胶成像分析系统照相并观察。

1.6 测序与序列分析 将扩增成功的 PCR 产物送北京天一辉远生物科技有限责任公司纯化并测序。登陆 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)和核糖体工程数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>),将测得的试验菌株 16S rRNA 基因序列与基因库中已注册的核酸序列进行比对,同时使用 EzTaxon server 2.1 进行比对分析,然后从比对结果中选取相关种属的模式菌株和非模式菌株的序列,通过 Mega 4 软件进行多序列匹配分析,采用邻位相连法构建系统发育树,所建发育树各分支的置信度由 Bootstrap 进行 1 000 次循环检验。

2 结 果

2.1 临床治疗过程与结果 此患者自 2012 年 3 月手术后 4 周出现发热、感染症状,经验抗感染治疗未见好转。继续分泌物送检细菌培养为阴沟肠杆菌,给予注射亚胺培南西司他丁及对症治疗后仍然持续发热,全身症状和白细胞升高亦未得到明显控制,入本院后继续经验性采用亚胺培南治疗,伤口局部取分泌细菌检验,第 1 次报告近平滑念珠菌和棒状杆菌,采取伏立康唑抗真菌治疗,效果不满意,临床考虑污染;第 2 次培养出类似棒状杆菌的阳性杆菌,怀疑放线菌,并通报临床,给予大剂量青霉素治疗,加左氧氟沙星静脉治疗,全身症状有所改善,但体温和白细胞升高控制不满意;第 3 次培养经 16S rRNA 鉴定为豚鼠耳炎奴卡菌,调整抗菌药,口服大剂量磺胺甲基异噁唑 1 个月后,全身自觉症状明显好转,创口逐步愈合,体温和白细胞计数恢复正常,观察数日后出院,随访无复发或并发症。

2.2 细菌表型特征 35℃培养 24 h 后,在血平板上可见细小菌落,麦康凯培养基上未见生长,涂片革兰染色后见阳性杆菌,呈分枝状,继续培养 48 h,麦康凯培养基可见细小、干燥、微黄色的菌落,革兰染色后大部分呈球杆状,形态不规则,大小不一,呈丝状和球杆状,着色不均匀,快速抗酸染色可见少数阳性。培养 7 d 后,菌落变黄,表面呈现皱褶状,并形成气生菌丝,有泥土气味,镶嵌于琼脂内,整个菌落不易乳化,且再次行革兰涂片染色,细菌呈球形或杆状,少数呈丝状,细菌编号为 WJ-20100。

2.3 生化鉴定结果 采用丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶(Ala-Phe-Pro-Arylamidase,APPA)、D-麦芽糖、尿素酶、酪氨酸芳胺酶、L-脯氨酸芳胺酶、棉子糖、鼠李糖、前列腺素 D、碱性磷酸酶、吡啶产生、蔗糖、丙二酸盐、侧金盏花发酵、D-山梨醇、酯酶、磷酸酶、β-D-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶等检测鉴定,显示豚鼠耳炎奴卡菌不液化明胶,0.4%明胶液基阴性,酪化牛乳阴性,不分解酪蛋白和酪氨酸,能分解黄嘌呤,50℃8 h 耐力实验阳性,鉴定结果见表 1。

表 1 豚鼠耳炎奴卡菌的生化反应鉴定结果					
生化鉴定	结果	生化鉴定	结果	生化鉴定	结果
APPA	阳性	鼠李糖	阳性	侧金盏花发酵	阴性
D-麦芽糖	阳性	前列腺素 D	阳性	D-山梨醇	阴性
尿素酶	阳性	碱性磷酸酶	阳性	酯酶	阴性
酪氨酸芳胺酶	阳性	吡啶产生	阳性	磷酸酶	阴性
L-脯氨酸芳胺酶	阳性	蔗糖	阴性	β-D-半乳糖苷酶	阴性
棉子糖	阳性	丙二酸盐	阴性	α-葡萄糖苷酶	阴性

2.4 药物敏感性检测结果 对哌拉西林、红霉素、头孢他啶、头孢哌酮、庆大霉素、头孢西丁、哌拉西林/他唑巴坦均耐药,对万古霉素、左氧氟沙星、亚胺培南、复方磺胺甲基异噁唑、依替沙星、环丙沙星、阿米卡星均敏感。

2.5 16S rRNA 基因测序结果 PCR 扩增得到的 1 500 bp 16S rRNA 序列与 GenBank 和核糖体工程数据库的序列进行比对,显示其与豚鼠耳炎奴卡菌的同源性为 99.8%。

3 讨 论

奴卡菌隶属于细菌域、放线菌纲、放线菌亚纲、放线菌目、棒杆菌亚目、奴卡菌科,目前属内有 89 种。奴卡菌病是由奴卡菌属引起的局限性或播散性、恶急性或慢性化脓性疾病;奴卡菌分布世界各地,动物亦可被感染,中国各地亦有报告。病原和流行病学显示,本病可由星形奴卡氏菌、巴西奴卡菌或豚鼠奴卡菌引起,病菌为需氧菌,存在于土壤。带菌的灰尘、土壤或食物通过呼吸道、皮肤或消化道进入人体,然后局限于某一器官或组织,或经血液循环播散至脑、肾或其他器官。本病的发生和传播途径与机体的抵抗力有密切关系。从皮肤侵入者,常呈局限性,可表现为足菌肿型或皮肤脓肿型,很少呈血源性扩散。不少学者认为奴卡菌,特别是星形奴卡氏菌,也是一种条件致病菌,本菌可自土壤中分离,经皮肤或呼吸道感染,然后直接向周围组织蔓延。中年患者多见,男性多于女性,组织损伤多为本病致病条件之一[3]。

病理变化主要表现为化脓性肉芽肿样,脓肿中央内可找到颗粒,周围有时存在菌鞘,其外中性粒细胞、淋巴细胞、异物巨细胞及浆细胞浸润,血管及其周围具有增殖现象[2,4]。皮下组织的病变与其他器官相似,于脓肿中央见有液化性坏死,中间为大量中性粒细胞浸润,周围则有成纤维细胞增生。星形奴卡菌是一种机会致病菌,主要通过呼吸道入侵肺部,引起化脓性炎症与坏死,症状类似肺结核,也可以引起动物的感染[5]。巴西奴卡菌可通过损伤皮肤而侵犯皮下组织,产生慢性化脓性肉芽肿。而此次分离的豚鼠耳炎奴卡菌较为少见,化脓性肉芽肿是其感染的典型表现。此菌生成缓慢,临床症状不典型,培养时间较长,与星形奴卡菌和巴西奴卡菌难以区分,诺卡菌属鉴定方法复杂,涉及乙酰胺水解、微生物敏感性试验、利用碳水化合物产酸、七叶苷水解、明胶液化、硝酸盐还原、氨基酸和核酸底物水解及温度耐受实验等。目前 16S rRNA 是鉴定豚鼠奴卡菌最可靠的方法。

该患者多次培养未检出豚鼠耳炎奴卡菌,可能与临床医师取材部位不准确或培养时间不够有关。该菌通过形态学和生化反应途径进行鉴定较为困难,16S rRNA 是鉴定豚鼠奴卡菌最有效的方法。磺胺类药物对本病具有特效,但每日剂量需达 6~10 g,并需应用 3~6 个月以上,可并用磺胺增效剂,急性期可加用链霉素(1~2 g/d),脑部感染者可加用环丝氨酸,其他药物选择包括阿米卡星、米诺环素和利奈唑胺等。此外,必要时对脓肿行切开引流及对症支持治疗也很重要。一般来说,奴卡菌病局限者预后佳,播散型者预后差,特别是累及中枢神经系统、耐药菌感染及延误诊断者,病死率高。本例患者为创口感染,经治疗后痊愈,预后良好。因此,早期正确诊断病原菌对本病的预后具有关键作用。

参考文献

[1] Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, et al. Clinical (下转第 1325 页)

检测,平均血小板计数分别为 $(1\ 339.0\pm127.0)\times10^9/L$ 、 $(1\ 536.0\pm110.0)\times10^9/L$ 及 $(1\ 367.0\pm178.0)\times10^9/L$,CV 值分别为 9.5、7.2 及 13.0。单份或双份血小板样本以 1:1 与 1:3 稀释后检测血小板计数的差异及 1:3 与 1:7 稀释后检测的差异均有统计学意义($P<0.05$)。

机采血小板采集后留样前,室温下静置 0、30、60、90、120 min 进行检测(1:3 稀释),平均血小板计数分别为 $(1\ 255.0\pm91.0)\times10^9/L$ 、 $(1\ 344.0\pm95.0)\times10^9/L$ 、 $(1\ 567.0\pm108.0)\times10^9/L$ 、 $(1\ 560.0\pm109.0)\times10^9/L$ 及 $(1\ 601.0\pm102.0)\times10^9/L$,CV 值分别为 7.3、7.1、6.9、7.0 及 6.4,静置 0、30 min 检测的血小板计数与静置 60、90、120 min 的检测值的差异有统计学意义($P<0.05$),而静置 60、90、120 min 检测的血小板计数之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

血小板输注是现代医学的一个重要治疗手段。研究发现,临床血小板输注无效的发生率为 37.25%。在影响血小板输注疗效的因素中,容易被忽视的是血小板制剂本身的质量问题,如血小板数量不足(机采血小板的平均计数合格率为 80.39%)等^[4]。为保证机采血小板制品的质量,需要围绕机采血小板采集前、中、后的各个环节做好相关工作,如采集前献血者的把关^[5]、采集前仪器参数的设置^[6]、采集后细菌监测及保存运输^[7]等,但保证机采血小板计数结果的准确性,机采血小板自采集后到检测“前过程”的质量控制显得十分重要,“前过程”主要包括留样方法、静置时间和稀释度等。

从本研究结果来看,笔者采用的“留样方法”(摇匀、灌满、回输、留样)保证了用于检测的“样本袋”与用于临床的“贮存袋”的血小板计数一致,样本袋的血小板计数能真实反映贮存袋的血小板数量。

在血液抗凝的情况下,血小板离体后,其形态立即发生变化,形成血小板可逆聚集体,随着时间延长,这种假性聚集会发生解聚^[8],血小板的这种特性要求其采集后应进行适当时间的静置。机采血小板采集后立即检测或静置 30 min 后检测与静置 60、90、120 min 后再取样检测的血小板计数的差异有统计学意义($P<0.05$),静置 60、90、120 min 后再取样检测的血小板计数的差异无统计学意义($P>0.05$),说明机采血小板采集后应在室温条件下静置 60~120 min 后再进行取样检测,过早检测可能导致血小板计数的不准确。

由于机采血小板的浓度高,其计数常会超过血细胞分析仪检测的线性范围上限,因此,其直接检测的结果不可信,必须对血小板样本稀释后再进行检测,但稀释度越高,相对误差越大。对于机采单份或双份血小板样本以 1:1 和 1:3 稀释后检测结果的差异显著,以 1:3 和 1:7 稀释后的检测结果也有显著性差异,且对于机采单份或双份血小板样本以 1:3 稀释后检测结果的 CV 均为较小值,故采集后的机采血小板制品应按 1:3 稀释后再进行检测为宜。

总之,准确计算采集后血小板制品中的血小板是机采血小板制品质量保证的基础^[9]。血站对采集后的血小板制品无论实行每月抽检监测或对每袋血小板制品进行检测的做法,都应注重“机采血小板自采集后至检测前过程的质量控制”,对采集后的血小板制品在室温下静置 60~120 min 后采用规范的留样方法进行留样,再进行 1:3 稀释后上机检测,从而保证机采血小板计数的准确性,确保每一袋发往临床的机采血小板制品均符合“国标”(每袋血小板计数不低于 $2.5\times10^{11}/L$)的质量要求,从而保证患者的治疗效果。

参考文献

[1] 林红,陈妍,黄成垠. 血小板制品细菌检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(2):187-189.
[2] 魏晴,田兆嵩. 血小板的临床应用[J]. 中国输血杂志,2008,21(9):732-733.
[3] 黎美娜. 2009 年广州地区机采血小板的质量分析[J]. 中国当代医药,2010,17(15):137-138.
[4] 罗贤瑞,熊志高. 机采血小板抽样检测及临床疗效评价[J]. 中国输血杂志,2011,24(5):423-425.
[5] 杨夏. 血站机采血小板的全面质量管理[J]. 新疆医学,2007,37(2):162-163.
[6] 洪纓. 机采血小板的质量保证[J]. 中国输血杂志,2007,20(3):254-255.
[7] 牛竹萍. 机采血小板的质量控制[J]. 延安大学学报:医学科学版,2008,6(3):112-113.
[8] 彭晓蓉. 浅谈血液分析时影响血小板检测的因素[J]. 长江大学学报:自然科学版,2011,8(6):212-213.
[9] 傅立强. 不同血液分析仪测定机采血小板计数结果的比较分析[J]. 检验医学,2010,25(10):794-795.

(收稿日期:2014-04-26)

(上接第 1321 页)

and microbiological features of nocardiosis 1997-2003[J]. J Med Microbiol,2007,56(Pt 4):545-550.
[2] Reddy AK, Garg P, Kaur I. Speciation and susceptibility of Nocardia isolated from ocular infections[J]. Clin Microbiol Infect,2010,16(8):1168-1171.
[3] Hartmann A, Halvorsen CE, Jenssen T, et al. Intracerebral abscess caused by Nocardia otitidiscaviarum in a renal transplant patient—cured by evacuation plus antibiotic therapy[J]. Nephron, 2000,86(1):79-83.

[4] Pelaez AI, Garcia-Suarez Mdel M, Manteca A, et al. A fatal case of Nocardia otitidiscaviarum pulmonary infection and brain abscess: taxonomic characterization by molecular techniques[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2009,8:11.
[5] Ribeiro MG, Salerno T, Mattos-Guaraldi AL, et al. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo,2008,50(3):177-185.

(收稿日期:2014-02-13)