

·病例报告·

发热患者血液标本中*Rothia aeria*的分离鉴定与系统发育分析曹敬荣¹ 王培昌¹ 沈定霞² 闵嵘¹ 张丽丽¹ 王育英¹ 王岩¹

【摘要】目的 总结*Rothia aeria*血流感染的临床与实验室鉴定特点,为临床诊疗提供帮助。方法 复习由该菌引起的血流感染病例,综合其形态学特征、生化特性、MALDI Biotyper质谱和16S rRNA序列相似性和系统发育分析对该菌进行分离培养、鉴定和药敏试验。**结果** *Rothia aeria*血流感染为国内首例(Genbank登录号为KF691779)报道,经质谱和16SrRNA可准确鉴定*Rothia aeria*。药敏试验结果显示其对左氧氟沙星、青霉素、氨苄西林、红霉素、庆大霉素、亚胺培南、哌拉西林和头孢他啶均敏感。临床根据药敏结果选用氨苄西林舒巴坦足量足疗程治疗,患者好转出院。**结论** *Rothia aeria*引起感染临床少见,16S rRNA和质谱能准确鉴定*Rothia aeria*,血培养对病原诊断有重要价值。

【关键词】 血培养; *Rothia aeria*; 16S rRNA; 系统发育分析; MALDI Biotyper质谱

Identification and phylogenetic analysis of *Rothia aeria* isolated from blood of a patient with fever Cao Jingrong¹, Wang Peichang¹, Shen Dingxia², Min Rong¹, Zhang Lili¹, Wang Yuying¹, Wang Yan¹.

¹Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China;

²Department of Microbiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Wang Peichang, Email: pcw1905@126.com.

【Abstract】Objective To investigate the clinical and laboratory features of bloodstream infection caused by *Rothia aeria*, and to supply better diagnosis and therapy. **Methods** The clinical diagnosis, treatments, outcomes and laboratory data, including blood culture, identification, antimicrobial susceptibility testing results were reviewed and analyzed, respectively. The bacterial identification was taken by 16S rRNA sequencing and MALDI Biotyper mass spectrometry. **Results** *Rothia aeria* bloodstream infection was the first report in China (Genbank login number for KF691779). MALDI Biotyper mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing could identify *Rothia aeria* accurately. The results of antimicrobial susceptibility testing by E-test method showed that levofloxacin, penicillin, ampicillin, erythromycin, gentamicin, imipenem, piperacillin and ceftazidime were all sensitive. Ampicillin/sulbactam were used with high-dose and long-term treatment, the patient was discharged. **Conclusions** The clinical infections caused by *Rothia aeria* are rare. 16S rRNA and MALDI Biotyper mass spectrometry could accurately identify *Rothia aeria*. Blood culture is of important value for pathogen detection.

【Key words】 Blood culture; *Rothia aeria*; 16S rRNA; Phylogenetic analysis; MALDI biotyper mass spectrometry

*Rothia aeria*是近年来发现的一种罗氏菌属,是一种新发的机会性病原菌,近年来不断有该菌所致感染的报道^[1-8],本研究结合一例由该菌引起的血流感染病例,综合其形态学特征、生化特性、16S rRNA序列相似性和系统发育分析对该菌进行分离培养、鉴定和药敏,报道如下。

一、病例资料

患者,男性,37岁,因“间断性发热3个月”于2013年5月28日入院。患者3个月前无明显诱因出现发热,体温最高达39.8℃,于北京某医院诊断为“上呼吸道感染”,给予头孢类抗菌药物治疗3 d后体温降至正常,之后间断出现体温

升高,抗炎及退热治疗疗效欠佳。2013年4月15日患者出现眼部肿胀、牙痛、口唇肿痛、头疼及右手指肿痛,来本院给予拉氧头孢钠静点抗炎及吲哚美辛栓剂治疗后,患者仍间断体温升高。入院查体:T:38.5℃,双肺呼吸音粗,主动脉瓣区可闻及收缩期杂音,可触及水冲脉。血常规示WBC: $10.71 \times 10^9/L$,中性粒细胞计数: $8.51 \times 10^9/L$,血红蛋白(Hb): 125 g/L。C-反应蛋白(CRP): 96.50 mg/L,红细胞沉降率(ESR): 59 mm/h。心脏彩色多普勒超声检查示先天性心脏病;心脏MRI示主动脉瓣返流,主动脉瓣形态欠规则。胸部CT示双侧胸腔少量积液,心包少量积液。入院后多次查血常规WBC均 $> 10.0 \times 10^9/L$,中性粒细胞 $> 8.5 \times 10^9/L$,发热时抽取血培养共5次,结果回报3次需氧血培养阳性,5次厌氧血培养均阴性。临床根据患者症状、体征及血培养结果,诊断为“菌血症、感染性心内膜炎?”,给

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.02.026

作者单位: 100053 北京,首都医科大学宣武医院检验科¹; 100084 北京,解放军总医院微生物科²

通信作者: 王培昌, Email: pcw1905@126.com

予氨苄西林舒巴坦(优立新)1.5 g、6 h/次,治疗14 d后,患者体温降至正常,复查3次血培养均为阴性,出院。

二、方法

(一) 患者细菌培养形态检查与VITEK-2 COMPACT 生化鉴定

血液标本注入需氧及厌氧血培养瓶于BD 9240血培养仪培养,抽取0.5 ml报警阳性液体,接种于需氧血平板2块,分别放置于含5%~10% CO₂和普通培养箱35 ℃培养24~72 h,观察细菌菌落特征,革兰染色镜下观察细菌形态,用VITEK-2 COMPACT细菌自动鉴定仪(生物梅里埃)鉴定。

(二) 抗菌药物连续梯度药敏实验(E-test)

严格按照CLSI中E-test操作指南,药敏条为万古霉素、青霉素、哌拉西林、氨苄西林、头孢他啶、亚胺培南、庆大霉素、克林霉素、红霉素和左氧沙星等。质控菌株ATCC25923。

(三) 分子生物学检测

1. DNA的提取:采用天根细菌DNA提取试剂盒提取DNA。

2. PCR的扩增:根据16S rRNA序列设计引物为27F和1492R^[1](上海英俊生物工程公司合成),上游序列(27F) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',下游序列(1492R) 5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3',扩增长度1 450 bp,反应体系25 μl: 10 × Buffer 2.5 μl, dNTPs (2.5 mol/L) 2 μl, Primer (10 μmol/L) 1 μl, Tag酶0.125 μl (TaKaRa), 双蒸水14.5 μl, DNA模板5 μl。PCR扩增参数: 94 ℃加热3 min, 94 ℃、45 s, 60 ℃、45 s、72 ℃、1.2 min,共35个循环,72 ℃延伸7 min。取PCR产物5 μl进行凝胶电泳(1%琼脂糖凝胶,1 × TAE电泳缓冲液,电压100 V、40 min),紫外凝胶成像系统分析仪观察,获取目的条带后,由上海英俊生物工程公司进行序列测定。

(四) 序列比对及系统发育分析

16S rRNA基因序列提交至GenBank进行BLAST比对,多序列比对采用CLustalw,采用MEGA 5.0软件中邻接法(Neighbor Joining)构建系统发育树,并用Bootstrap法分析系统发育树的可靠性(重复数1 000),与GenBank数据

库中相关种属的16S rRNA基因进行同源分析。

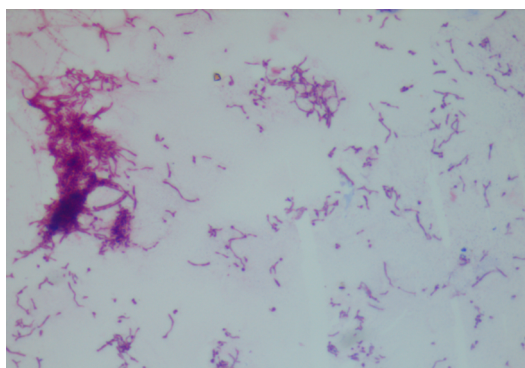
三、结果

1. 分离鉴定和生化特征:血培养仪报警阳性后,直接涂片镜检可见革兰阳性杆菌、分枝状、丝状或放射状,无芽孢、荚膜,抗酸染色阴性,如图1。转种于2块血平板,分别放于含5%~10%的CO₂孵箱和普通孵箱35 ℃培养,24 h、48 h、72 h分别观察菌落形态,2块血平板上均有灰白色粗糙不规则菌落生长,表面有皱褶,不透明、凸起、周围有光泽,如图3。用VITEK-2 COMPACT NH鉴定卡进行生化反应检测,结果触酶(+),氧化酶(-),水解明胶,脲酶(-),蔗糖(+),七叶苷(+),麦芽糖(+),焦谷氨酸芳酰胺酶(+),甘露糖(+),葡萄糖(+),棉子糖(-),木糖(-)、乳糖(-)。

2. E-test药敏结果:按照CLSI 2012葡萄球菌药敏判断规则,本实验MICs示万古霉素4.0 μg/ml (I)、左氧氟沙星0.094 μg/ml (S)、青霉素0.002 μg/ml (S)、氨苄西林0.016 μg/ml (S)、克林霉素2.0 μg/ml (I)、红霉素0.016 μg/ml (S)、庆大霉素4.0 μg/ml (S)、亚胺培南0.064 μg/ml (S)、哌拉西林和头孢他啶0.064 μg/ml (S)。ATCC25923在质控范围。

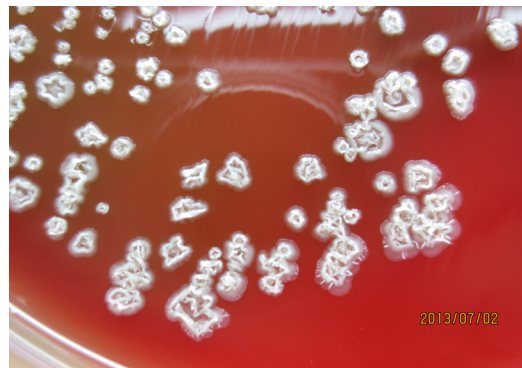
3. 16S rRNA基因序列分析及系统发育树构建:PCR产物经测序拼接后获得该菌株的16S rRNA序列(1 421个核苷酸)与BLAST程序比对,发现该菌与罗氏菌属7种细菌^[2]序列相似度较高(99.0%以上相似),用MEGA 5.0软件中Neighbor Joining方法构建系统发育树,结果显示与*Rothia aeria* 100%同源(可信度100%),所测序列申请Genbank,登录号为KF691779,如图3。

讨论 本研究报道一例37岁男性发热患者,伴有先天性心脏病,考虑上呼吸道感染,使用抗菌药物后感染并未得到有效控制,患者反复发热,多次血培养报告显示阳性,细菌菌落和革兰染色镜检形态相同,VITEK-2 COMPACT鉴定率很低(33%的麦氏放线菌、丙酸杆菌和小棒状杆菌),故考虑该患者感染菌株为临床少见细菌,本研究采用质谱鉴定仪(MODI-TOF-MS)和分子学方法对该感染菌株进行鉴定。由于该菌生长缓慢,表型鉴定及生化特征无法正确判定细菌具体种属;进一步通过16S rRNA序列



注:弯曲、缠绕、革兰阳性棒状、分枝状、丝状或放射状,无芽孢、荚膜

图1 革兰染色镜检结果(×1 000)



注:灰白色粗糙不规则菌落,表面有皱褶,不透明、凸起、周围有光泽,贴附于培养基上

图2 血平板5% CO₂培养72 h结果

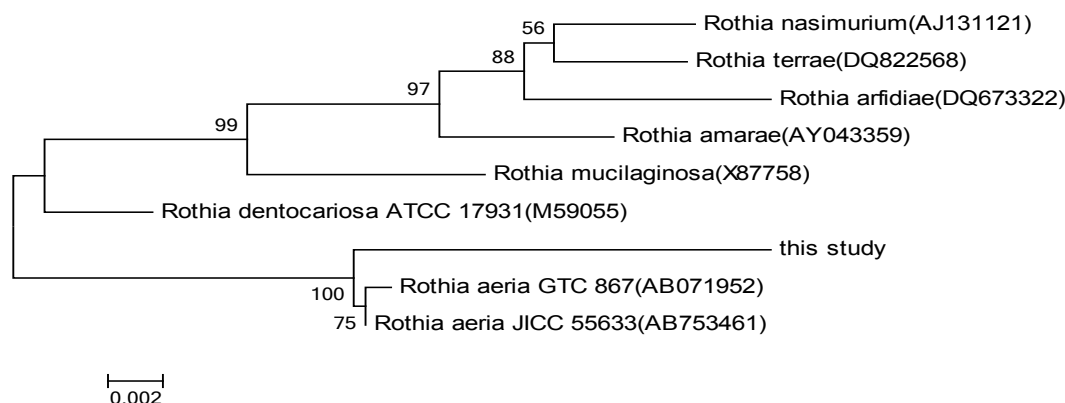


图3 16S rRNA基因系统发育树分析

测定和系统发育分析显示,该菌与*Rothia aeria*高度同源(100%),最终将该菌鉴定为*Rothia aeria*(GenBank登录号KF691779),该菌引起的血流感染为我国首次报告。

近年来,全球共报道*Rothia aeria*及所致感染病例报道7例,2004年首次报道从俄罗斯空间站的水和空气中发现*Rothia aeria*^[3],之后分别从心内膜炎、败血症、颈部脓肿和肺炎等患者的血、痰及活检组织中分离出该菌^[4-13]。*Rothia aeria*的培养及染色特点为需氧,首次培养5%~10% CO₂环境可促进其生长,革兰染色阳性,分枝状、丝状、球杆状细菌,菌落特点为灰白色粗糙不规则菌落,表面有皱褶,不透明、凸起、周围有光泽,贴附于培养基上,该形态特征易误鉴定为奴卡菌属、放线菌属等,但奴卡菌属为弱抗酸阳性,而放线菌属多为专性厌氧菌从而可进行鉴别。

由于CLSI中无*Rothia aeria*的药敏规则 and 解释(敏感、中介和耐药),因此,本研究参照CLSI 2012中葡萄球菌的药敏规则判断其敏感性。E-test法药敏试验结果提示,该菌除对万古霉素和克林霉素不敏感外,对大部分所测药物均敏感,与以往报道结果一致^[3-11]。患者住院期间经验性用药选择氨苄西林舒巴坦(优立新)1.5 g、8 h/次未能控制感染,进一步根据药敏试验结果加大剂量及用药疗程(优立新1.5 g、6 h/次、2周)抗感染治疗,最终患者血流感染得到有效控制。

分析常规鉴定手段无法给出该感染菌正确鉴定的原因是由于商品化的生化鉴定系统数据库有限,能鉴定的微生物种类受限,而罗氏菌在国内外研究均较少,现有的API试剂条仅能鉴定龋齿罗氏菌,而VITEK-2 Compact自动化鉴定系统数据库仅包含黏滑罗氏菌属,因此,造成了本研究中未能给出正确的鉴定结果。16S rRNA分析法因其能体现不同菌属之间的差异成为了理想的基因鉴定靶序列,是目前细菌分类和鉴定的重要手段之一,能够准确、快速鉴定*Rothia aeria*,准确率显著优于现有的商品化生化鉴定。

综上,对于临床少见菌的鉴定,应结合传统的鉴定方法(培养特征、镜检形态学特征)、生化反应(VITEK自动鉴定仪、API等)及16S rRNA基因序列分析、系统发育树分析等多种方法进行综合判断,才能获得科学、准确的鉴定结果。

曹敬荣,王培昌,沈定霞,等.发热患者血液标本中*Rothia aeria*的分离鉴定与系统发育分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(2):254-256.

致谢:感谢首都医科大学附属北京同仁医院检验科鲁辛辛教授及王梅等同事在质谱鉴定中的帮助和指导。

参 考 文 献

- Galkiewicz JP, Kellogg CA. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7828-7831.
- 蒋波, 范一灵, 房蕊, 等. 洁净室环境中一株细菌bd5的分离鉴定及系统发育分析[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(6): 424-429.
- Li Y, Kawamura Y, Fujiwara N, et al. *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 3): 827-835.
- Verrall AJ, Robinson PC, Tan CE, et al. *Rothia aeria* as a cause of sepsis in a native joint[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(7): 2648-2650.
- Michon J, Jeulin D, Lang JM, et al. *Rothia aeria* acute bronchitis: the first reported case[J]. Infection, 2010, 38(4): 335-337.
- Hiyamuta H, Tsuruta N, Matsuyama T, et al. First case report of respiratory infection with *Rothia aeria*[J]. J Jpn Respir Soc, 2010, 48(3): 219-223.
- Monju A, Shimizu N, Yamamoto M, et al. First case report of sepsis due to *Rothia aeria* in a neonate[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(5): 1605-1606.
- Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, et al. A first report of *Rothia aeria* endocarditis complicated by cerebral hemorrhage[J]. Intern Med, 2012, 51(23): 3295-3299.
- Falcone EL, Zelazny AM, Holland SM. *Rothia aeria* neck abscess in a patient with chronic granulomatous disease: case report and brief review of the literature[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(6): 1400-1403.
- Mahobia N, Chaudhary P, Kamat Y. *Rothia* prosthetic knee joint infection: report and mini-review [J]. New Microbes New Infect, 2013, 1(1): 2-5.
- Nicodemo AC, Gonçalves LG, Odongo FC, et al. *Rothia aeria* endocarditis in a patient with a bicuspid aortic valve: case report[J]. Braz J Infect Dis, 2014, 18(5): 561-564.
- Kim UJ, Won EJ, Kim JE, et al. *Rothia aeria* infective endocarditis: a first case in Korea and literature review[J]. Ann Lab Med, 2014, 34(4): 317-320.
- Crowe A, Ding NS, Yong E, et al. *Rothia aeria* mitral valve endocarditis complicated by multiple mycotic aneurysms: laboratory identification expedited using MALDI-TOF MS[J]. Infection, 2014, 42(2): 419-423.

(收稿日期: 2015-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)