

·病例报告·

肺鼻疽奴卡菌病并发多发脑脓肿的病原学鉴定与临床分析

王育英 曹敬荣 张丽丽 高世超 闵嵘 谢威 张红艳 李文军

【摘要】目的 探讨肺鼻疽奴卡菌病合并多发脑脓肿的病原学特点,为临床诊疗该类疾病提供依据。**方法** 分析患者的临床资料、影像学检查、诊疗经过和实验室对病原菌的分离鉴定、药敏试验和16S rRNA序列测定并复习相关文献。**结果** 该患者有长期服用糖皮质激素史,临床表现为发热、咳嗽等,实验室检测白细胞、中性粒细胞、C-反应蛋白升高;痰培养2 d后有细菌生长,菌落白色粗糙、有皱褶,革兰染色镜检为串珠状或分枝状革兰阳性杆菌,1%硫酸弱抗酸染色及抗酸染色均阴性;分离菌经细菌自动化鉴定仪鉴定未出结果,质谱和16S rRNA测序鉴定为鼻疽奴卡菌。药敏结果显示阿米卡星、环丙沙星、亚胺培南、左氧氟沙星、利奈唑胺和米诺环素敏感,复方新诺明、头孢曲松、氨苄西林和红霉素耐药。肺部影像学显示,双肺多发斑片状阴影、结节,后发展为空洞,脑CT示多发脑脓肿。应用复方磺胺甲噁唑和头孢曲松联合治疗后肺部空洞吸收好转,经外科手术引流及脓肿切除后患者病情稳定,回当地治疗。**结论** 分子学方法鉴定鼻疽奴卡菌快速、准确,早期病原诊断是治疗奴卡菌病的关键,治疗应以磺胺类为主的联合治疗、早期、足量、足疗程。

【关键词】鼻疽奴卡菌;鉴定;奴卡菌病;脑脓肿

Pathogen identification and clinical analysis of *Nocardia farcinica* isolated from a patient suffered from pulmonary nocardiosis complicated with brain abscess Wang Yuying, Cao Jingrong, Zhang Lili, Gao Shichao, Min Rong, Xie Wei, Zhang Hongyan, Li Wenjun. Department of Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: Cao Jingrong, Email: 13683581168@126.com

【Abstract】 Objective To identify the pathogen of pulmonary nocardiosis complicated with brain abscess and to provide assistance for clinical diagnosis and therapy. **Methods** The clinical data, imaging examination, diagnosis and treatment were reviewed, respectively, and the identification of pathogenic bacteria, antimicrobial susceptibility testing and 16S rRNA sequence were determined. **Results** The patient had a history of long-term administration of corticosteroids. Clinical manifestations were fever and cough. The results of laboratory showed that white blood cell, neutrophil cells and C-reactive protein (CRP) were all above normal range. The colonies were white, rough and surface folds after 2 days culture of sputum. Gram staining for the sputum samples and the isolate were beaded or branched Gram-positive bacilli. The weak acid fast staining test by 1% sulfuric acid and acid fast staining test were both negative. The isolate could not be identified by automatic bacteria identification instrument. *Nocardia farcinica* was identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MODI-TOF MS) and 16S rRNA sequencing. Antimicrobial susceptibility detection by KB disks method showed that it were sensitive to amikacin, ciprofloxacin, imipenem, levofloxacin, linezolid and minocycline, but resistant to cotrimoxazole, ceftriaxone, ampicillin and erythromycin. Lung imaging showed that the double lung multiple patchy shadows, nodules, and later developed into the cavity. Brain CT showed multiple brain abscess. After application of sulfamethoxazole ceftriaxone combined with, the pulmonary cavity was absorbed and the patient's condition were stable after surgical drainage and excision of abscess. **Conclusions** Molecular method for identification of *Nocardia farcinica* is rapid, accurate. Early pathogenic diagnosis was the

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.05.029

基金项目:首都临床特色重点专项课题(No. Z141107002514012);首都医科大学校长基金(No. 2016JYY96)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院检验科

通讯作者:曹敬荣, Email: 13683581168@126.com

key for treatment of nocardiosis. Combination treatment including sulfonamides, early, sufficient, full course of treatment should be executive.

【Key words】*Nocardia farcinica*; Identification; Nocardiosis; Brain abscess

奴卡菌病是由奴卡菌感染引起的急、慢性化脓性疾病, 主要见于免疫功能低下者, 肺奴卡菌病最常见^[1-9] (约占75%), 可引起血源性播散至皮肤或中枢神经系统、肾脏等部位或器官, 形成多发性脓肿或融合成大脓肿。由于患者临床表现和影像学检查无特异性, 易误诊为肺结核、肺部真菌病或肿瘤等其他疾病^[2, 7-10], 而播散性奴卡菌病的鉴别诊断则更复杂。奴卡菌病的病原菌以星形奴卡菌和巴西奴卡菌多见^[1-9, 11], 鼻疽奴卡菌引起者较少^[6, 11-13]。为提高对奴卡菌病的认知及诊疗水平, 现结合本院1例肺鼻疽奴卡菌病并发多发脑脓肿患者的临床资料及病原学鉴定进行分析, 总结如下。

资料与方法

一、临床资料

患者男性, 64岁, 因间断发热30个月、咳嗽、咯痰3个月于2015年3月27日入院。既往哮喘病史5年, 慢性胃炎病史5年, 2月前行肠息肉切除术, 前列腺炎病史10余年, 吸烟史30年(已戒6年), 左下肢静脉曲张病史40余年。30个月前当地医院考虑“Sweet综合征、皮炎、血管炎”, 给予“强的松联合甲氨蝶呤、地塞米松、头孢西丁、美洛西林舒巴坦、更昔洛韦”等治疗, 仍间断发热, 体温波动于36.6~38.6℃, 胸部CT示右肺中-下叶、左肺上叶尖后段阴影, 内有空洞, 双侧胸膜增厚。入院查体: T 36.5℃, P 78次/min, 双肺呼吸音粗, 未闻及干湿啰音, 左下肢静脉曲张, 余查体未见明显异常。入院后检查血常规示白细胞 $10.42 \times 10^9/L$, 中性81.0%, C-反应蛋白19.28 mg/L, 红细胞沉降率为20 mm/h, 免疫球蛋白IgE 476.65 IU/dl; 多次行G试验、GM试验阴性; 多次痰、支气管镜刷片找真菌及培养阴性; 多次痰找抗酸杆菌阴性, TB-Spot阴性; 胸部CT示病灶增大, 空洞形成, 壁厚且不均匀, 部分支气管管壁增厚、管腔狭窄, 病变周围可见小斑片及毛刺, 纵膈内未见异常增大淋巴结, 经皮肺组织穿刺病理结果示急性炎症, 未见肿瘤细胞; 给予哌拉西林钠舒巴坦疗效欠佳。入院后2周患者出现左侧肢体乏力, 行头颅MRI增强检查示皮髓质交界区多发小病灶、大水肿, 行腰椎穿刺送脑脊液涂片未找见细菌、抗酸杆菌及隐球菌, 培养阴性; 脑脊液病理提示感染。综合考虑为奴卡菌等特殊机会致病菌感染, 送痰涂片为革兰阳性杆菌和球菌, 痰培养5 d后报告结果为鼻疽奴卡菌, 确定诊断“肺奴卡菌病, 多发脑脓肿”, 调整药物为头孢曲松2.0 g (2次/d) + 复方磺胺甲噁唑0.96 g

(3次/d) 治疗后患者肢体乏力现象减轻、痰由黄脓痰变为黄黏痰。经治疗1周后复查胸部CT示炎症有所吸收, 病灶较前减小, 体温恢复正常, 症状好转, 转外院行脑脓肿穿刺引流及开颅脑脓肿切除手术, 并继续复方磺胺甲噁唑治疗, 目前随访病情稳定、恢复较好。

二、病原菌鉴定与药敏试验

1. 细菌培养形态检查与VITEK-2 Compact生化鉴定: 痰标本均匀涂抹玻片进行革兰染色镜检, 观察白细胞数、细菌种类及数量, 取粘稠部分接种于哥伦比亚血平板和中国蓝平板, 置于含5%~10% CO₂培养箱35℃培养48~72 h, 观察细菌菌落特征及纯培养菌落革兰染色、抗酸及弱抗酸染色镜下形态, 用VITEK-2 Compact细菌自动鉴定仪(生物梅里埃)和质谱分析仪(北京同仁医院)进行鉴定。

2. 分子生物学检测与序列比对: 采用天根细菌DNA提取试剂盒提取DNA。根据文献^[12]合成引物27F和1492R(上海Invitrogen公司合成), 扩增目的片段长度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, Taq酶0.125 μl (TaKaRa), 双蒸水14.5 μl, DNA模板5 μl。PCR扩增条件为94℃、3 min, 94℃、45 s + 60℃、45 s + 72℃、1.2 min, 共35个循环后72℃延伸7 min。取PCR产物5 μl进行凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统观察目的条带并委托上海Invitrogen公司进行序列测定。所得的16S rRNA基因序列提交至GenBank进行BLAST比对最终确定病原菌。

3. 药敏试验: 参照CLSI标准M-H纸片法操作, 抗菌药物有阿米卡星、环丙沙星、亚胺培南、左氧氟沙星、利奈唑胺、米诺环素、庆大霉素、妥布霉素、复方新诺明、头孢曲松、氨苄西林和红霉素。质控菌株为铜绿假单胞菌ATCC27853。

结 果

一、细菌形态学特点与分离鉴定

痰直接涂片镜检可见串珠状或分枝状革兰阳性菌, 见图A; 接种痰标本的血平板于含5%~10%的CO₂孵箱35℃培养1 d、2 d、3 d和4 d分别观察菌落形态, 2 d后可见白色粗糙不规则小菌落, 表面有皱褶, 不透明、凸起、周围有光泽, 见图B。抗酸染色结果阴性, 1%硫酸弱抗酸染色结果为阳性, 见图C。用VITEK-2 Compact NH、ANC鉴定卡均未能给出鉴定结果, 生化检测明胶液化(-), 葡萄糖(+), 半乳糖(+), 甘油(+), 肌醇(-)。质谱鉴



注：图A：痰直接涂片镜检菌丝显微镜下的形态（革兰染色， $\times 100$ ）；图B：鼻疽奴卡菌在血平板菌落的形态；图C：1%硫酸弱抗酸染色显微镜下的形态（弱酸染色， $\times 100$ ）

图1 肺鼻疽奴卡菌镜检与培养结果

定结果为鼻疽奴卡菌（*Nocardia farcinica*）。

二、16S rRNA基因扩增结果及序列分析

PCR产物经测序拼接后获得该菌株的16S rRNA序列（1350个核苷酸）与BLAST程序比对，发现该菌与奴卡菌属中的鼻疽奴卡菌序列相似度较高（ $> 99.0\%$ ），最终确定病原为鼻疽奴卡菌（*Nocardia farcinica*）。

三、药敏试验结果

按照CLSI 2013葡萄球菌药敏判断规则，药敏结果显示阿米卡星（36 mm、S）、环丙沙星（39 mm、S）、亚胺培南（31 mm、S）、左氧氟沙星（32 mm、S）、利奈唑胺（32 mm、S）、米诺环素（20 mm、S），庆大霉素（6 mm、R）、复方新诺明（6 mm、R）、头孢曲松（6 mm、R）、妥布霉素（R）、氨苄西林（11 mm、R）和红霉素（11 mm、R）。质控菌ATCC27853在质控范围。

讨 论

在我国，奴卡菌临床感染相对少见，其病原菌中星形奴卡菌、巴西奴卡菌和鼻疽奴卡菌是最常见和报道最多的致病菌^[1-9, 11-13]。肺奴卡菌病是临床较常见的奴卡菌病，该病临床表现无特异，常见症状有咳嗽、咳脓痰、高热、出汗、呼吸困难、胸痛、乏力、纳差等，主要为急性坏死性肺炎、肺脓肿、胸膜炎等表现，使临床诊断奴卡菌感染较困难，经验性抗菌治疗常无效；由于奴卡菌极易血行播散导致脑、肾、皮肤、关节等多发脓肿，使得临床鉴别诊断更加复杂困难。文献^[2-7, 9, 12-13]报道奴卡菌易感人群以免疫力低下（如HIV感染、器官移植）或接受糖皮质激素治疗者居多，本例是在患结缔组织病基础上长期使用糖皮质激素、免疫力低下而继发肺奴卡菌病，并发生中枢神经系统播散引起多发脑脓肿病例，患者出现肢体乏力，颅脑MRI提示多发脑脓肿，但脑脊液涂片和培养均为阴性，与文献^[2]报道一致。

实验室和辅助检查方面，胸部影像表现多种多样，亦无特异性，本例患者的影像学主要表现为双肺纹理增强、多发空洞、结节状及片状高密度影；患者外周血白细胞及

中性粒细胞比例升高，CRP升高，红细胞沉降率加快，故根据患者的症状、实验室辅助检查等很难确诊，易与肺部其他细菌、真菌感染、肺结核或肿瘤相混淆而误诊或漏诊^[2]。本例患者经多次痰涂片找抗酸杆菌均为阴性，TB-Spot阴性排除结核可能；多次G试验、GM试验及痰和支气管镜刷片真菌涂片及培养阴性，经验性抗真菌治疗无效，排除真菌感染可能；肺组织活检及支气管刷片病理均提示感染而未发现肿瘤细胞排除肺部肿瘤的可能；多次痰培养未见致病菌，与痰常规培养和观察时间短（48 h出报告）、痰标本中杂菌生长过度等因素相关，最终经过延长痰培养时间，鉴定出鼻疽奴卡菌而确定肺奴卡菌病，确诊时间为20 d。

奴卡菌病的最终确诊需依据细菌培养的病原学结果，病原菌检查可取痰、脓液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液及肺组织块等直接涂片镜检及培养，若发现革兰染色阳性、弱抗酸染色阳性的串珠样、细长、弯曲分枝状菌丝，可初步疑似为奴卡菌感染，应延长培养时间进行菌落观察和鉴定。值得注意的是奴卡菌在脓肿和排液中常可见到黄色或黑色小颗粒，但在痰或脑脊液标本中见不到此种颗粒，只能观察到分叉或杆状的革兰阳性杆菌是其感染的一特点。由于目前与人感染相关的奴卡菌有很多种，传统的鉴定方法很难满足临床要求快速、准确鉴定到种的需求，文献^[1]应用药敏试验进行初步判断，可为不能进行分子诊断的实验室提供可用的鉴别方法。而分子方法越来越多地用于菌种的快速和准确鉴定中，基质飞行质谱仪和16S rRNA基因测序可鉴定出90%以上的奴卡菌种^[11-12, 14]。本例患者痰培养菌落，经质谱和16S rRNA最终鉴定为鼻疽奴卡菌，从而为临床诊治提供了依据。

奴卡菌病的治疗首选磺胺类抗菌药物，但近年来不断出现对该类药物耐药的奴卡菌的报道^[4, 6, 15]，尤其鼻疽奴卡菌耐药率逐渐增加（85%）。因此，推荐将磺胺类与阿米卡星、头孢曲松或亚胺培南等联合治疗，对于不能耐受磺胺类或重症患者可选择利奈唑胺作为替代药物。而发生播散者可联合外科手术提高治愈率（如脑脓肿穿刺引流等）。本例患者药敏试验显示复方新诺明耐药，但临床应用罗氏芬2.0 q 12 h + 复方磺胺甲噁唑0.96 q 8 h治疗后肺部

体征疗效显著,脑脓肿控制不完全最后经穿刺引流和切除术后恢复良好。

总之,临床诸如奴卡菌等少见菌的感染病原学诊断,需要临床医生和微生物实验室人员共同协作,尤其提高细菌室人员对于菌种的鉴定能力和识别水平对有效指导临床诊治和改善患者预后有重要意义。

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黄艳飞等同事在质谱鉴定中的帮助和指导。

参 考 文 献

- 1 孙慧芳,王金良. 奴卡菌的新鉴定方法和程序[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(12):878-879.
- 2 黄慧,陆志伟,徐作军. 诺卡菌感染26例临床特点分析[J]. 中华结核和呼吸杂志,2010,33(9):651-655.
- 3 刘学花,田卓民. 肺奴卡菌病一例报告[J]. 天津医药,2013,41(3):286-287.
- 4 Wilson JW. Nocardiosis: updates and clinical overview[J]. Mayo Clin Proc,2012,87(4):403-407.
- 5 王慧珠,郭晶晶,李敏,等. HIV患者合并星形奴卡菌肺炎的实验室诊断研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2014,8(5):694-695.
- 6 王春雷,刘颖梅,黎斌斌,等. 系统性红斑狼疮合并肾周脓肿一例[J]. 中华内科杂志,2014,53(7):574-575.
- 7 麦琳,刘春涛. 肺奴卡菌病伴颅内感染一例并文献复习[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2013,12(2):201-203.
- 8 Bittar F, Stremmler N, Audié JP, et al. *Nocardia farcinica* lung infection in a patient with cystic fibrosis: a case report[J]. J Med Case Rep, 2010,4(1):84-88.
- 9 陈茂红,李兴锐,王和融. 系统性红斑狼疮继发星形奴卡菌感染1例报道及文献复习[J]. 安徽医药,2012,6(4):501-502.
- 10 Chen J, Zhou H, Xu P, et al. Clinical and radiographic characteristics of pulmonary nocardiosis: clues to earlier diagnosis[J]. PLoS One,2014,9(3):e90724.
- 11 Paulo Victor Pereira Baio, Juliana Nunes Ramos, Louisy Sanches dos Santos, et al. Molecular identification of nocardia isolates from clinical samples and an overview of human nocardiosis in Brazil[J]. PLoS Negl Trop Dis,2013,7(12):e2573.
- 12 Pasquale De Nardo, Maria Letizia Giancola, Salvatore Noto, et al. Left thigh phlegmon caused by *Nocardia farcinica* identified by 16S rRNA sequencing in a patient with Leprosy: a case report[J]. BMC Infect Dis,2013,13:162.
- 13 Sang Taek Heo, Kwan Soo Ko, Ki Tae Kwon, et al. The first case of catheter-related bloodstream infection caused by *Nocardia farcinica*[J]. J Korean Med Sci,2010,25(11):1665-1668.
- 14 PR Hsueh, TF Lee, SH Du, et al. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species[J]. J Clin Microbiol,2014,52(7):2371-2379.
- 15 Patricia S, Conville, Barbara A. Brown-elliott, multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species[J]. J Clin Microbiol,2012,50(4):1270-1280.

(收稿日期: 2015-08-27)

(本文编辑: 孙荣华)

王育英,曹敬荣,张丽丽,等. 肺鼻疽奴卡菌病并发多发脑脓肿的病原学鉴定与临床分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(5):639-642.