

• 个案分析 •

一株罕见 *Ihumii* 放线菌的分离和鉴定张维清¹, 林宇岚¹, 甘龙杰¹, 陈守涛¹, 张文明², 杨 滨^{1△}

(福建医科大学附属第一医院:1. 检验科;2. 骨科, 福建福州 350005)

关键词: *Ihumii* 放线菌; MALDI-TOF-MS; 16S rRNA**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.04.035**中图法分类号:**R446.5**文章编号:**1673-4130(2019)04-0508-03**文献标识码:**C

放线菌大多存在于健康人口腔、上呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道等与外界相通的腔道,是寄居人体的一种正常菌群^[1-2]。当机体免疫力减弱、口腔卫生不良、拔牙或外伤时,可侵入组织导致皮肤、皮下组织、肌肉、骨骼及中枢神经系统化脓性感染^[3]。根据感染的途径和涉及的器官不同,临床上分为面颈部、胸部、腹部和中枢神经系统感染。其主要特征为慢性化脓性肉芽肿病变,以向周围组织扩展形成瘻管并排出带有硫磺样颗粒的脓液为特征。绝大多数放线菌易引起内源性感染,大量应用免疫抑制剂是一个重要的诱发因素。2015 年,法国科学家从一个 50 岁的 HIV 感染者粪便中首次分离出一株新的放线菌,并命名为 *Ihumii* 放线菌^[4]。福建医科大学附属第一医院于 2016 年收治一例由 *Ihumii* 放线菌引起的膝关节化脓性感染,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男,72 岁,既往患有高血压和甲状腺功能亢进。就诊本院前 2 月因外伤致“左髌骨粉碎性骨折”,于院外行“左髌骨骨折切口复位内固定术”,术后切口愈合不良。术后 1 个月,因“左膝切口裂开”再次求诊,该院行“左膝部二期清创术”,术后 10 d 切口流出黄脓液、发恶臭、伴发热。遂于当地医院多次行清创术,治疗上予抗感染、补液及对症治疗(具体不详),今为求进一步诊治,患者就诊福建医科大学附属第一医院骨科,门诊拟“左膝关节感染”收入住院(图 1A)。实验室检查,白细胞计数(WBC): $17.9 \times 10^9/L$,血红蛋白(Hb):112 g/L,血小板计数(PLT): $230 \times 10^9/L$,C 反应蛋白(CRP):59.5 mg/L, PCT:0.38 ng/mL。

1.2 仪器与试剂 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)、甲酸、 α -氰基-4-羟基苯丙酸(HCCA)均由德国 Bruker 公司及 Sigma 公司提

供;ABI 2700 普通 PCR 仪(美国应用生物系统);快速革兰染色液(Baso);细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物:27f:AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 和 1492r:TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT 由上海生工合成,PCR 反应体系采用美国 Promega 公司产品。

1.3 细菌培养及形态观察 脓液分泌物标本分区划线接种于 2 块哥伦比亚血平板、一块沙保罗葡萄糖琼脂培养基、一块选择巧克力平板。一块血平板与选择巧克力平板置于 5% 二氧化碳培养箱中,35 ℃ 恒温孵育,每天观察血平板的生长情况;另一块血平板行厌氧培养,35 ℃ 恒温孵育,每天观察平板的生长情况。沙保罗葡萄糖琼脂培养置于 25 ℃ 恒温孵育,亦每天观察其生长状况。术后坏死组织经研磨后,亦行上述同条件培养。根据第四版《全国临床检验操作规程》,阳性培养进行革兰染色,油镜观察菌体形态。

1.4 细菌 MALDI-TOF-MS 鉴定 用牙签挑取单个待检菌落,均匀涂抹于加样金属靶板小圈内,同时在另一小圈内亦均匀涂抹 ATCC25922 大肠埃希菌质控菌株,待样本室温干燥后,加入 1 μ L 的甲酸(70%),室温干燥后,加入 1 μ L 的 HCCA,待室温干燥后上机检测。

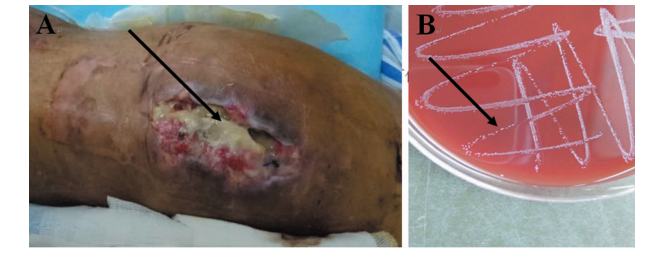
1.5 16S rRNA 基因扩增及系统发育树的构建 采用煮沸法提取细菌的基因组核酸。细菌 16S rRNA 的 PCR 扩增条件参考文献^[5]。扩增产物经电泳,确认存在目的条带,产物送上海生工测序。测序的序列用 Vector NTI 8.0 软件包中的 Contig Express 组件拼接。获得的 16S rRNA 序列在 GeneBank 中进行 Blast 同源性比对初步确定其分类位置。用 Bioedit (version3.3)合并样本序列(序列名 2016R)和参考序列为一个队列,用 MEGA5.1 软件以 Kimura 双参数方法构建 16S rRNA 系统进化树。

△ 通信作者, E-mail: Binyang2864@163.com。

本文引用格式:张维清,林宇岚,甘龙杰,等.一株罕见 *Ihumii* 放线菌的分离和鉴定[J].国际检验医学杂志,2019,40(4):508-510.

2 结 果

2.1 病原菌培养结果 脓液和术后坏死组织经分离培养后,均得到一株革兰阳性短杆菌。其生长速度较缓慢,初次培养 48 h 后可形成直径大约 1~2 mm、灰白色、圆形、光滑、突起、边缘整齐、无 β 溶血性菌落(见图 1B),与文献报道的一致^[4]。在沙保罗葡萄糖琼脂培养基和选择巧克力平板均不能生长。



注:A 为患者入院时左膝关节创伤伴化脓性感染;B 为 5%CO₂ 培养箱 35 °C 培养 48 h 后血平板菌落形态

图 1 术后坏死组织和病原菌培养结果

2.2 细菌 MALDI-TOF-MS 鉴定结果 目标菌通过 MALDI-TOF-MS 检测及 BioType 软件分析,获得的目标菌肽指纹图谱如图 2 示。鉴定结果报告显示为瑞丁放线菌,但可信度为 1.902。根据 MALDI-TOF-MS 报告对结果的解读^[6],当可信度值为 1.700~1.999 时,可鉴定放线菌属,不能确定为放线菌某种,需进一步鉴定。

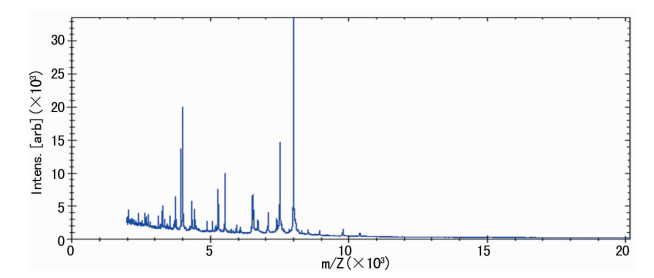


图 2 Ihumii 放线菌 MALDI-TOF-MS 鉴定结果图

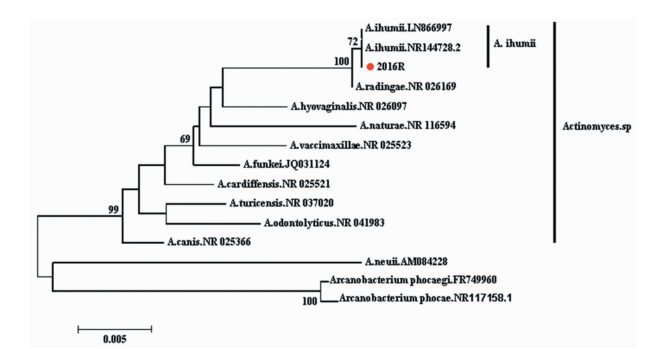


图 3 2016R 放线菌部分 16S rRNA 基因与 Ihumii 放线菌及其他放线菌系统进化树

2.3 16S rRNA 基因序列鉴定及进化树分析 扩增得到 16S rRNA 基因的反向序列,大小约 870 bp,正向多次测序均失败,存在较多杂峰、背景信号干扰,所以未纳入本次分析中。反向的一半 16S rRNA 序列

经编辑,提交 NCBI 的 Blast 显示,其与 Ihumii 放线菌(核酸登录号为 LN866997 和 NR144728.2)相似率为 100%。为了能够更直观反映该菌来源,本课题组利用 MEGA5.1 软件 Neighbor-joining tree 法,构建 16S rRNA 进化树。如图 3 所示,可以明显看出,本次发现的 2016R 放线菌株与 2 株 2015 年由法国科学家发现的 Ihumii 放线菌明显在一簇上,Bootstrap 值为 72%。而且,他们共同与其他参考放线菌成一簇,Bootstrap 值为 99%。

3 讨 论

放线菌病是一种少见的因感染放线菌所致的慢性感染性疾病,人兽共患,可产生局部化脓或肉芽肿性疾病,以多发脓肿和窦道瘘管为特征。根据现有的文献报道,放线菌病存在明显的区域和性别差异,农村明显高于城市,男性多于女性,城市发病率仅为农村的 1/10,男女比例约为 3:1^[7]。目前放线菌属内有 47 个种,由于其生在缓慢、培养条件苛刻,在行常规细菌培养时,容易被遗漏^[8]。同时,又由于国内对放线菌感染临床特点、诊断、鉴别诊断等研究仍较少,而且,该菌属所致疾病常呈隐匿性,缺乏较为典型的临床表现,容易造成临床医生的诊断与治疗困难,产生误诊或漏诊。MALDI-TOF-MS 是最近发展起来的一种可以快速鉴定细菌的新技术,依据不同菌种形成特异性的质谱指纹图谱对细菌进行鉴定,该技术可以快速、准确鉴定临床常见菌^[9],但对少见、罕见菌鉴定时,由于其菌谱库中种类数量有限,其在鉴定方面仍存在着缺陷^[6]。据 LYNCH 等^[10]报道, MALDI-TOF-MS 在鉴定放线菌方面,仅 41% 的放线菌能准确鉴定到种,9% 鉴定到属,存在 50% 无法准确鉴定。本文开始采用 MALDI-TOF-MS 进行鉴定,并以鉴定为瑞丁放线菌种,但鉴定值为 1.902,所以可以确定 2016R 为放线菌属某种,但无法确定其准确种。

利用 16S rRNA 序列同源性分析对细菌进行分类鉴定的技术已经比较成熟。随着 GeneBank 数据库的不断完善,应用该技术可以对病原菌进行快速、准确简便的分类鉴定。目前,应用 16S rRNA 鉴定细菌菌属时,当目标菌与 GeneBank 中比对序列相似度大于 99%,可以鉴定为种;相似度为 97%~99%,鉴定为属;相似度低于 97%,无法鉴定,可能为某种新的细菌^[11]。因此,本研究又采用 16S rRNA 测序技术对菌株进一步复核鉴定,最终与 Ihumii 放线菌相似度为 100%;同时如图 3 所示,2016R 菌株与 Ihumii 放线菌成一簇,由此可以鉴定本研究新发现的菌株为 Ihumii 放线菌。本研究相对不足之处是未得到 16S rRNA 约 1 500 bp 长度的序列,尽管如此,但根据以往的文

献报道,序列在 300~900 bp 之间就可以适用于多数广谱 PCR 的诊断^[12]。所以本研究中 870 bp 长度的序列在通过 GeneBank 中比对和进化树分析后是可以确定该菌就是 *Ihumii* 放线菌的。

对于膝关节创伤放线菌感染,由于病例较少,目前尚无统一的治疗方案。根据相关文献报道^[13],目前多首选 β -内酰胺类抗菌药物进行治疗,在临床治疗过程中也根据药敏结果使用一种或多种抗菌药物联合治疗,疗程约为 6 到 12 个月,早期诊断及有效抗菌药物治疗的治愈率可达 90%^[14]。但也有专家指出,在治疗中应按照患者具体病情情况、感染部位的不同,选择手术或非手术治疗^[15]。本病例中患者创伤明显、组织坏死、脓液外流,通过手术,不但可以清除坏死组织加速伤口愈合,而且能够获取深部脓液、坏死病灶等送微生物室培养和病理检查。该患者最终经过清创、皮瓣移植、抗菌药物应用,3 个月及半年后回访复查,患者得以痊愈。

放线菌病在目前的临床病例中并不常见,其诊断除了需要影像学、病理学分析外,更重要的是临床医生能否正确采集脓液、组织标本,及时送检,为微生物实验室提供合格标本。临床微生物工作者也需要加强对放线菌病的认识,有条件是实验室可适当开展更可靠的现代诊断方法,如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、分子生物学分类方法,以便能快速诊断放线菌病并指导临床医生合理用药。同时,本病例提示,在处理感染性疾病时,除了常见细菌、真菌、病毒感染外,要警惕少见菌、罕见菌的感染,以免误诊耽误治疗,危及患者生命安全。

参考文献

- [1] ZELYAS N, GEE S, NILSSON B, et al. Infections caused by actinomyces neuii; a case series and review of an unusual bacterium[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2016, 27(15):601-605.
- [2] DUBOURG G, DELORD M, GOURIET F, et al. Actinomyces gerencseriae hip prosthesis infection; a case report [J]. J Med Case Rep, 2015, 9(1):1-4.
- [3] BING A-U, LOH S F, MORRIS T, et al. Actinomyces species isolated from breast infections[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(10):3247-3255.
- [4] NDONGO S, KHELAIFIA S, BITTAR F, et al. Actinomyces ihumii, a new bacterial species isolated from the digestive microbiota of a HIV-infected patient[J]. New Microbes New Infect, 2016, 4(12):71-72.
- [5] 屈平华, 赵红波, 黄彬, 等. 卫生部微生物室间质评 1012 菌的鉴定与放线菌属的系统发生分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9):814-819.
- [6] PATEL R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. Clin Chem, 2015, 61(1):100-111.
- [7] 吕学明, 袁绍纪, 张荣伟, 等. 放线菌性脑脓肿一例[J]. 中华临床感染病杂志, 2013, 6(1):55-56.
- [8] KONONEN E, WADE W G. Actinomyces and related organisms in human infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(2):419-442.
- [9] BAO R, GAO X D, HU B J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for identification of Corynebacterium species[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(9):3239-3245.
- [10] LYNCH T, GREGSON D, CHURCH D L. Species-Level identification of actinomyces isolates causing invasive infections: multiyear comparison of vitek MS (Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry) to partial sequencing of the 16S rRNA gene[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(3):712-717.
- [11] DRANCOURT M, BERGER P, RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5):2197.
- [12] 刘朝军. 16SrDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7):774-776.
- [13] BOYANOVA L, KOLAROV R, MATEVA L A, et al. Actinomycosis: a frequently forgotten disease[J]. Future Microbiol, 2015, 10(4):613-628.
- [14] 李昌波, 胡新春, 杨劼, 等. 粘性放线菌败血症 1 例并文献复习[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(8):1531-1533.
- [15] 朱博, 郑琦, 石仕元, 等. 髌关节放线菌感染报道一例[J]. 中华临床感染病杂志 2017;10(1):60.

(收稿日期:2018-09-03 修回日期:2018-12-29)