

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.11.009

少见诺卡菌 MALDI-TOF MS 鉴定结果及临床感染特点分析*

范 宁¹, 谢立民¹, 段雪红^{1△}, 鱼丽萍², 朱 琳³

陕西省咸阳市第一人民医院:1. 检验科;2. 神经内科;3. 药理学室, 陕西咸阳 712000

摘 要:目的 评价基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在少见诺卡菌中的鉴定价值,提高诺卡菌感染的临床诊治率。方法 分析 11 例(12 株)诺卡菌临床感染患者特征,以 16S rRNA 基因测序结果为参考标准,比较 MALDI-TOF MS 鉴定的准确率。结果 12 株诺卡菌中 10 株(83.3%)准确鉴定到种。64%(7/11)的患者有 1 种及以上基础疾病,以高血压、冠心病、支气管扩张症、慢性阻塞性肺疾病和糖尿病为主。诺卡菌对复方磺胺甲噁唑的敏感率为 71.43%。结论 MALDI-TOF MS 可对少见的诺卡菌进行快速鉴定,当患者伴有基础疾病或使用免疫抑制剂时应考虑诺卡菌感染的可能。

关键词:少见菌; 诺卡菌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 药敏试验

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)11-1477-04

MALDI-TOF MS identification results of rare Nocardia and its clinical infection characteristic analysis*

FAN Ning¹, XIE Limin¹, DUAN Xuehong^{1△}, YU Liping², ZHU Lin³

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurology; 3. Pharmacology Room, Xianyang Municipal First People's Hospital, Xianyang, Shaanxi 712000, China

Abstract: Objective To evaluate the identification value of MALDI-TOF MS in rare Nocardia in order to increase the clinical diagnostic and treatment rate of Nocardia infection. **Methods** The characteristics in 11 cases (12 strains) of Nocardia clinical infection were analyzed. With the 16S rRNA gene sequencing results as the reference standard, the accuracy of MALDI-TOF MS identification was compared. **Results** Among 12 strains of Nocardia, 10 strains (83.3%) were accurately identified to the species level. 64% (7/11) of the patients had one kind or more underlying diseases, which were dominated by hypertension, coronary heart disease, bronchiectasis, COPD and diabetes. The sensitivity of Nocardia to Compound Sulfamethoxazole was 71.43%. **Conclusion** MALDI-TOF MS can rapidly identify rare Nocardia. When the patients are accompanied with basic diseases or using immunosuppressive agents, the possibility of Nocardia infection should be considered.

Key words: rare bacteria; Nocardia; MALDI-TOF MS; drug sensitivity test

诺卡菌是一类需氧放线菌,革兰染色为细长丝状、分枝明显的阳性杆菌,抗酸染色弱阳性,易引起免疫功能低下人群感染。诺卡菌培养和鉴定比较困难,临床分离率低。随着分子生物学技术和质谱技术的应用,其临床分离率逐渐升高,国内诺卡菌感染病例报道数量呈上升趋势^[1-4],但由于诺卡菌感染患者的临床表现无特异性,易被误诊为其他疾病,如结核病、真菌感染、肿瘤等,从而延误了疾病治疗的最佳时机,甚至导致死亡^[1]。现对本院 2019 年 6 月至 2021 年 6 月分离的诺卡菌的鉴定结果及临床感染特点进行分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 将本院 2019 年 6 月至 2021 年 6 月来源于 11 例患者的 12 株诺卡菌作为回顾性研究样本,剔除同一患者相同部位重复菌株。校准菌株大肠

埃希菌 ATCC 8739,质控菌株皮疽诺卡菌 ATCC 3308。

1.2 仪器与试剂 VITEK MS 全自动快速微生物质谱检测系统(法国生物梅里埃公司)、16S rRNA 基因测序仪[赛音生物技术(上海)有限公司]、哥伦比亚血琼脂平板(郑州安图公司)。

1.3 方法 将从 11 例患者分离到的可疑菌株利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行鉴定,同时与 16S rRNA 基因测序结果对照;对其中 7 株菌进行肉汤稀释法药敏试验;收集确诊患者的临床资料及实验室检查结果。(1)质谱鉴定。选择 24~72 h 疑似菌落利用 VITEK MS 质谱检测系统进行鉴定,未嵌入培养基生长的菌落按一般细菌鉴定流程操作,嵌入培养基生长的菌落按“分枝杆

* 基金项目:陕西省咸阳市 2020 年重点研发计划(2020k02-106)。

作者简介:范宁,女,主任技师,主要从事临床微生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: Duanhx1124@163.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220506.1450.012.html\(2022-05-07\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220506.1450.012.html(2022-05-07))

菌、诺卡菌流程”鉴定。所有菌株均涂两个点位。(2) 基因测序。将菌株送赛音生物技术(上海)有限公司进行 16S rRNA 基因测序。

2 结 果

2.1 临床资料 11 例患者中男 5 例、女 6 例,年龄 48~80 岁、平均(64.9±11.1)岁。64%(7/11)的患者有 1 种及以上基础疾病,以高血压、冠心病、支气管扩

张、慢性阻塞性肺疾病(COPD)和糖尿病为主。2 例患者放弃治疗,其中患者 1 有肝炎、糖尿病和 COPD 等基础疾病,患者 9 合并支气管扩张症和肺癌。2 例无基础疾病者未使用抗菌药物,病情好转。共送检标本 12 份,其中呼吸道标本 9 份(75%,9/12),包括痰和肺泡灌洗液各 4 份及 1 份鼻腔分泌物。见表 1。

表 1 11 例诺卡菌感染病例临床特点

编号	性别	年龄(岁)	基础疾病	标本来源	临床表现	转归
1	男	71	有	胸腔积液	间断发热、咳嗽、咳痰、胸腔积液	放弃治疗
2	男	48	无	肺泡灌洗液	发热、咳嗽	好转
3	女	57	无	血液	左侧输尿管脓肿、宫颈息肉	好转
4	女	51	有	痰、肺泡灌洗液	反复咳嗽、咳痰、咯血	好转
5	男	64	有	创面	右小腿红肿热痛伴局部破溃、渗出	好转
6	女	61	有	肺泡灌洗液	右肺脓肿	好转
7	女	77	有	痰	咳嗽	好转
8	男	80	有	痰	重症肺炎	好转
9	男	78	有	痰	头晕伴气短、咳嗽	放弃治疗
10	女	70	无	鼻腔分泌物	鼻黏膜充血、糜烂	好转
11	女	57	无	肺泡灌洗液	咳嗽、咳痰	好转

2.2 实验室检查数据 64%的患者白细胞计数升高,36%的患者中性粒细胞比例升高,70%的患者 C 反应蛋白、超敏 C 反应蛋白水平升高,75%的患者降钙素原水平升高。见表 2。

表 2 11 例诺卡菌感染病例实验室检查结果

编号	白细胞计数 (×10 ⁹ /L)	中性粒细胞 比例(%)	降钙素原 (ng/mL)	C 反应蛋白 (mg/L)	超敏 C 反应 蛋白(mg/L)
1	10.88	86.20	1.06	153.36	>5.00
2	15.36	73.70	2.66	15.60	>5.00
3	10.32	79.50	0.08	13.74	>5.00
4	5.12	65.60	0.12	<5.00	1.22
5	12.13	73.70	1.38	11.42	>5.00
6	13.97	74.90	0.07	55.88	>5.00
7	3.92	66.00	0.02	<5.00	<0.50
8	18.09	94.00	15.44	52.42	>5.00
9	16.11	84.60	0.61	208.35	>5.00
10	4.98	63.30	0.02	<5.00	0.14
11	5.23	66.30	0.03	<5.00	0.62

2.3 病原菌培养及鉴定

2.3.1 显微镜检查 诺卡菌革兰染色镜下典型形态为成簇的细长丝状、分枝明显的阳性杆菌,见图 1;弱抗酸染色可见红色细长丝状菌体,见图 2。

2.3.2 菌落形态 哥伦比亚血琼脂平板置于 5% CO₂ 培养箱 35 ℃培养 2~7 d 或者更长时间,可见微黄色或白色、干燥菌落(图 3)或表面褶皱/堆积卷曲、嵌入平板生长的菌落(图 4)。由于菌种不同,菌落形

态之间存在差异。

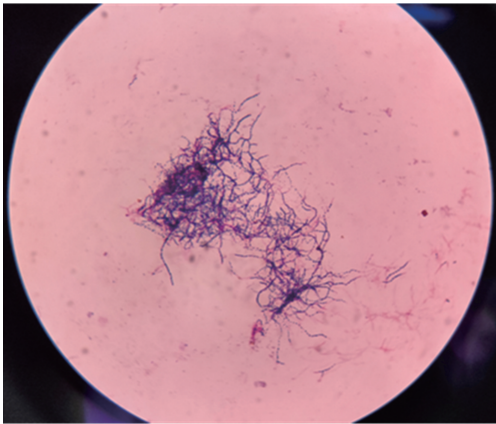


图 1 革兰染色形态(×1 000)

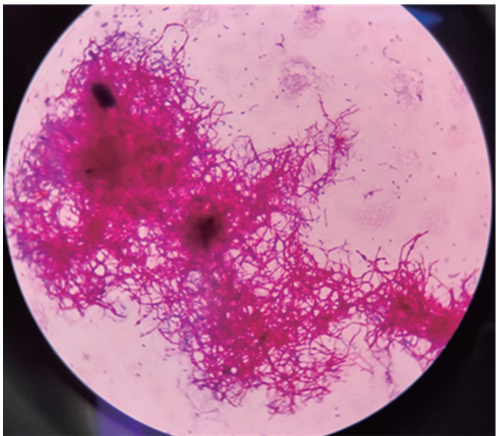


图 2 弱抗酸染色形态(×1 000)

2.3.3 菌种鉴定 经基因测序,12 株诺卡菌全部鉴定到种,VITEK MS 质谱检测系统鉴定到种为 10 株(83.3%),未鉴定到种的包括 1 株天美诺卡菌(错误鉴定为亚洲诺卡菌)和 1 株豚鼠耳炎诺卡菌(无鉴定值)。见表 3。



图 3 哥伦比亚血平板干燥菌落(3 d)

2.4 药敏试验 对其中 7 株诺卡菌进行肉汤稀释法药敏试验,结果显示,7 株诺卡菌对利奈唑胺、妥布霉素和阿米卡星全部敏感,对复方磺胺甲噁唑的敏感率为 71.43%(5/7),对阿莫西林/克拉维酸和喹诺酮类药物全部耐药。对头孢曲松和亚胺培南敏感率均为 57.14%(4/7)。7 株诺卡菌肉汤稀释法药敏试验最低

抑菌浓度(MIC)结果见表 4。

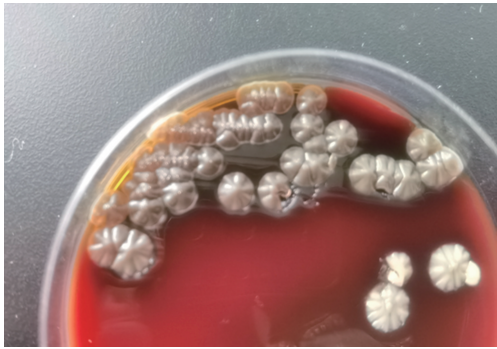


图 4 哥伦比亚血平板嵌入生长菌落(5 d)

表 3 VITEK MS 质谱鉴定与 16S rRNA 基因测序结果

菌种	测序鉴定(n)	质谱鉴定(n)	质谱鉴定率(%)
皮疽诺卡菌	5	5	100.0
圣乔治教堂诺卡菌	2	2	100.0
巴西诺卡菌	1	1	100.0
脓肿诺卡菌	1	1	100.0
亚洲诺卡菌	1	1	100.0
天美诺卡菌	1	0	0.0
豚鼠耳炎诺卡菌	1	0	0.0

表 4 7 株诺卡菌肉汤稀释法药敏试验 MIC 结果(μg/mL)

细菌	MNO	CIP	MXF	CLA	LNZ	TOB	AMK	IPM	CRO	AMC	CAZ	MEM	SXT	TZP	FOX
皮疽诺卡菌	2.0	16	16	16.0	2	1	4	32	128	64/32	64	32	16.0/304.0	256/4	128
天美诺卡菌	0.5	≥16	16	0.5	1	1	4	1	4	≥64/32	≥64	1	0.5/9.5	32/4	8
脓肿诺卡菌	0.5	16	8	0.5	1	1	4	1	4	≥64/32	64	1	0.5/9.5	32/4	8
亚洲诺卡菌	0.5	≥16	16	0.5	1	1	4	1	4	≥64/32	16	1	0.5/9.5	32/4	8
圣乔治教堂诺卡菌	1.0	8	4	2.0	2	1	4	8	32	16/8	64	4	1.0/19.0	256/4	128
皮疽诺卡菌	0.5	≥16	8	0.5	1	1	4	1	4	32/16	16	1	0.5/9.5	32/4	8
豚鼠耳炎诺卡菌	0.5	16	4	0.5	1	1	4	32	128	64/32	≥64	8	16.0/304.0	≥256/4	128

注:MNO 为米诺环素;CIP 为环丙沙星;MXF 为莫西沙星;CLA 为克拉霉素;LNZ 为利奈唑胺;TOB 为妥布霉素;AMK 为阿米卡星;IPM 为亚胺培南;CRO 为头孢曲松;AMC 为阿莫西林/克拉维酸;CAZ 为头孢他啶;MEM 为美罗培南;SXT 为复方磺胺甲噁唑;TZP 为哌拉西林/他唑巴坦;FOX 为头孢西丁。

2.5 治疗与转归 11 例患者中 2 例放弃治疗;5 例应用了复方磺胺甲噁唑,好转出院;1 例使用甲硝唑/头孢西丁,好转出院;1 例使用美罗培南/米诺环素,症状缓解;2 例未使用抗菌药物。

3 讨 论

诺卡菌生长缓慢,生化反应不活泼,菌种鉴定效果不佳^[5],对其鉴定到种水平通常难度较大。传统的生化鉴定方法不仅费时费力,而且随着菌种分类的不断增多,鉴定到种水平受到了很大程度限制。近年来,MALDI-TOF MS 技术由于其快速、准确、灵敏、自动化及高通量等特点,在微生物鉴定中的应用发展迅猛^[6]。本研究利用 VITEK MS 系统鉴定诺卡菌,与 16S rRNA 基因测序结果基本一致,种鉴定率为 83.3%(10/12),由于天美诺卡菌在 VITEK MS IVD V3.2 版本数据库中缺乏相关数据,被错误鉴定为亚

洲诺卡菌,豚鼠耳炎诺卡菌由于菌落噬琼脂生长严重,提取蛋白时存在琼脂干扰,导致质谱图谱分辨率降低而无法鉴定。陈莹等^[5]与王鹏等^[6]报道利用 MALDI-TOF MS 技术可对 85.1%和 84.8%的诺卡菌鉴定到种,与本研究结果接近。美国的一项研究结果略低(76%)^[7]。德国研究者则在质谱鉴定时经甲酸和乙腈处理后,种鉴定率从 74.4%提高到 89.7%^[8]。诺卡菌分类和鉴定比较复杂,虽然 MALDI-TOF MS 技术可以将最常见的诺卡菌准确鉴定至种或复合物水平,但其局限性是系统数据库不完善,对于不常见菌种,仍需通过基因测序鉴定。由于 16S rRNA 基因测序技术复杂且难以常规开展,CONVILLE 等^[9]建议使用更多的 MALDI-TOF MS 系统,作为第 1 步鉴定方法,验证最常见的诺卡菌种,以减少需要基因测序或转送到参考实验室进行鉴定

的菌株数量。随着细菌分离种类的增多,数据库的不断更新,未来 MALDI-TOF MS 技术对于少见菌的鉴定准确率将提高。

不同国家和地区诺卡菌菌种分布有所不同。美国和澳大利亚最常见分离菌种为新诺卡菌,法国和泰国为皮疽诺卡菌,我国的北京和河北地区报道以圣乔治教堂诺卡菌最常见^[5]。本研究以皮疽诺卡菌(41.7%, 5/12)最多,其次为圣乔治教堂诺卡菌(16.7%, 2/12),与 HUANG 等^[10]报道结果基本一致。由于国内与国外文献关于诺卡菌报道的样本量偏少,菌种分布的差异可能还需进一步研究、证实。

不同诺卡菌的感染部位和感染途径有所差异,如脓肿诺卡菌、皮疽诺卡菌和盖尔森基兴诺卡菌主要造成肺部感染和播散性感染,巴西诺卡菌则常引起皮肤感染^[2]。本研究 1 例腿部感染患者即由巴西诺卡菌引起。肺是诺卡菌最常侵犯的器官,可导致肺诺卡菌病^[11]。本研究 12 株诺卡菌以呼吸道标本占比最高,为 75%(9/12)。本研究 1 株天美诺卡菌分离自肺泡灌洗液,该菌是 2007 年在日本新发现的菌种,目前仅有 4 例报道^[12-13]。

文献^[14]报道,诺卡菌感染者中,免疫功能低下者较非免疫功能低下者病情更重,病死率更高,但二者临床表现无差异。本研究中 64%(7/11)的患者有 1 种及以上基础疾病。2 例放弃治疗者为典型的免疫功能低下人群,其中患者 1 患有肝炎、糖尿病和 COPD,患者 9 患有支气管扩张症和肺癌,且二者年龄均超过 70 岁。2 例无基础疾病者未使用抗菌药物,其中 1 例经鼻息肉摘除术后,通过盐水冲洗、雾化治疗后好转出院,随访治疗效果较好,考虑与局部病灶未扩散,手术治疗效果较好及患者无基础疾病有关。另 1 例仅针对呼吸道症状对症治疗出院,不排除标本污染或者定植可能。

目前,治疗诺卡菌感染首选使用磺胺类药物,但本研究中诺卡菌对复方磺胺甲噁唑的耐药率为 28.57%,高于黄磊等^[15]的报道,不同于文献^[16]报道的全部敏感,应引起重视。

综上所述,本院分离的诺卡菌以皮疽诺卡菌为主,肺部感染为主要感染方式,患者多患有 1 种及以上基础疾病,所以当临床使用常见抗菌药物效果不佳,患者伴有基础疾病或使用免疫抑制剂时应考虑诺卡菌感染的可能。MALDI-TOF MS 技术可对临床少见的诺卡菌进行快速鉴定,实验室应逐步开展诺卡菌药敏试验,为临床合理用药提供可靠依据。

志谢:本研究 16S rRNA 基因测序及诺卡菌药敏试验均由上海市东方医院检验科郭建老师支持完成!

参考文献

[1] 张淑香,钱玉婷. 诺卡菌感染 9 例临床分析[J]. 中国感染

与化疗杂志,2017,17(4):356-360.

- [2] 周佳,金博,黄磊,等. 诺卡菌感染的菌种和药敏试验回顾性分析[J]. 重庆医学,2018,47(19):2545-2548.
- [3] 李娟,刘前军,吴灿,等. 1 例慢性阻塞性肺病合并圣乔治教堂诺卡菌感染及文献复习[J]. 临床肺科杂志,2019,24(12):2292-2294.
- [4] 毛雅云,陈磊,翁恒. 肺诺卡菌病 25 例临床特征分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2020,20(6):613-617.
- [5] 陈莹,贾艳增,时东彦,等. 河北地区多中心临床分离诺卡菌菌种分布[J]. 临床检验杂志,2020,38(10):790-792.
- [6] 王鹏,隗明,杨春霞,等. VITEK MALDI-TOF MS 在临床分离诺卡菌快速鉴定中的简易流程优化[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(11):990.
- [7] BODY B A, BEARD M A, SLECHTA E S, et al. Evaluation of the Vitek MS V3.0 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* species[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(6): e00237-e00243.
- [8] CHHATWAL P, WOLTEMA S, ZIESING S, et al. Molecular characterization and improved diagnostics of *Nocardia* strains isolated over the last two decades at a German tertiary care center[J]. Excli J, 2021, 20: 851-862.
- [9] CONVILLE P S, BROWN-ELLIOTT B A, SMITH T, et al. The complexities of *nocardia* taxonomy and identification[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(1): e01419-e01427.
- [10] HUANG L, CHEN X C, XU H P, et al. Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of *Nocardia* species in China: 2009—2017[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2019, 94(2): 165-172.
- [11] 唐癸丹,黄丹,吴东,等. 29 例肺诺卡菌病的临床特征分析[J]. 广东医科大学学报, 2021, 39(4): 399-402.
- [12] MARTINEZ-GAMBOA A, CERVERA-HERNANDEZ M E, TORRES-GONZALEZ P, et al. First case of *Nocardia amamiensis* pulmonary infection in Mexico[J]. New Microbes New Infect, 2017, 16: 1-2.
- [13] ELBALLAT M, CHISHTI I, VIJAYVARGIYA P, et al. A rare case of disseminated *Nocardia amamiensis* with pulmonary, cerebral, and cutaneous involvement [J]. Chest, 2017, 152(4): 100A.
- [14] STEINBRINK J, LEAVENS J, KAUFFMAN C A, et al. Manifestations and outcomes of *nocardia* infections: comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients[J]. Medicine, 2018, 97(40): e12436.
- [15] 黄磊,李湘燕,孙立颖,等. 23 株诺卡菌的耐药特点分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(13): 1520-1524.
- [16] 谢栩硕,杨清莹,郑建铭,等. 诺卡菌感染患者 44 例的临床特征及其预后[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(1): 35-39.

(收稿日期:2021-10-16 修回日期:2022-02-11)