

## • 案例分析 •

## 蜡样芽孢杆菌引起化脓性脑膜炎的病原学检测及文献复习\*

谢 威,高世超,曹敬荣<sup>△</sup>,闵 嵘,王育英,张红艳,赵琪彦,路 尧,王培昌

(首都医科大学宣武医院检验科,北京 100053)

关键词:蜡样芽孢杆菌; 化脓性脑膜炎; 16SrRNA; 质谱

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.069 文献标志码:C 文章编号:1672-9455(2016)14-2069-03

蜡样芽孢杆菌为革兰阳性芽孢杆菌(芽孢不突出菌体),需氧或兼性厌氧,轻微运动性,广泛存在于土壤、灰尘、水和医院环境<sup>[1]</sup>(如空气过滤和通风设备<sup>[2]</sup>、样本收集管、床单<sup>[3]</sup>及重复使用的毛巾<sup>[4]</sup>、静脉导管<sup>[5]</sup>、光纤纤维支气管镜检测设备<sup>[6]</sup>等),可因污染土壤和食品作为一种食源性疾病进行报道(食物中毒)<sup>[7]</sup>。临床上各种标本(血液、伤口和痰等)分离到该菌时,常被认为是污染菌未鉴定到种或被误鉴为枯草芽孢杆菌,导致临床和微生物室对其研究和报道相对较少<sup>[1,6]</sup>。为了提高对该菌引起感染的认识及诊疗水平,本文结合本院蜡样芽孢杆菌引起的化脓性脑膜炎病例的临床资料及病原学鉴定进行分析并复习相关文献,总结如下。

## 1 资料与方法

**1.1 病历资料** 患者,男,58岁,患者无明显诱因出现发热、寒战、神志模糊5h于2015年10月8日来本院就诊,急诊输液(具体不详)后无缓解。既往肝癌病史2年,曾因肝癌胸椎转移行手术治疗和鞘内吗啡泵植入术。入院查体:神志淡漠,自发睁眼,不回答问题或答非所问,查体配合差。双眼对光反射灵敏,眼球运动正常,有水平粗大眼震,左眼上视差。四肢肌张力略高,双上肢腱反射活跃(++++),双侧病理征阳性。X线检查示双侧胸腔内积液,胸椎术后改变。血常规示白细胞 $14.3 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞86.6%。临床据患者急性起病,结合病史特点和实验室检查高度怀疑颅内感染,行腰椎穿刺抽取脑脊液行常规、生化和微生物相关检测,可见脑脊液浑浊,白细胞数 $6502 \times 10^6/L$ ,蛋白432 mg/dL,葡萄糖14.4 mg/dL,涂片为革兰阳性杆菌(部分有细胞内吞噬现象),给予万古霉素和美罗培南抗感染治疗,脑脊液培养为蜡样芽孢杆菌,药敏显示对万古霉素、利奈唑啉、庆大霉素、左氧氟沙星等敏感。因考虑感染可能与吗啡泵植入相关,行吗啡泵取出术+腰大池引流术,并监测脑脊液变化。脑脊液血培养瓶培养及导管培养结果均为蜡样芽孢杆菌,药敏模式一致,临床调整抗菌药物为左氧氟沙星抗感染治疗2周。患者感染症状控制,病情平稳,出院。

## 1.2 细菌培养、鉴定与药敏试验

**1.2.1 脑脊液细菌培养** 将脑脊液3 000 r/min离心15 min后去上清,接种哥伦比亚血平板35℃培养24~48 h观察菌落特征。脑脊液血培养:无菌操作将2 mL脑脊液接种于儿童血培养瓶,置于BD BACTEC9120血培养仪培养,仪器阳性报警后涂片镜检,转种哥伦比亚血平板培养。导管尖端培养:采用半定量接种培养方法,取导管尖端1~2 cm,在血平板表面往返滚动一次,35℃培养24 h,若细菌菌落数每平板大于等于15 cfu判为培养阳性。

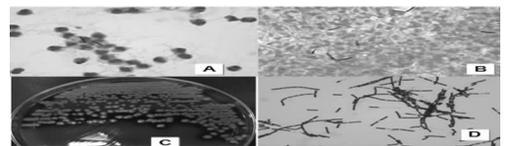
**1.2.2 细菌鉴定** 采用MALDI Biotyper质谱(BRUKER公司)和16SrRNA分子鉴定。细菌基因组DNA提取按天根细

菌DNA提取试剂盒进行,脑脊液基因组DNA提取按QIAamp UCP Pathogen Mini Kit说明书进行。委托上海英俊公司合成细菌通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'和1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增,测序结果登录Genbank进行Blast比对以确定菌属。质谱鉴定方法:将纯培养单个菌落均匀涂抹在靶板,加1 μL 70%甲酸,室温干燥后加1 μL基质,室温干燥,将靶板放入质谱仪进行检测,分值>2.00表示可信度非常高,鉴定到种的水平(绿色);1.70~1.99之间需要通过补充方法来确认,鉴定到属的水平(黄色);<1.70表示鉴定结果不可靠(红色)。

**1.2.3 药敏试验** 用KB法检测分离菌对青霉素、克林霉素、头孢曲松、红霉素、头孢西丁、庆大霉素、左氧氟沙星、利奈唑啉、万古霉素、氨苄西林舒巴坦、苯唑西林和复方新诺明的敏感性,药敏纸片为Oxoid产品,药敏判定标准参照CLSI2014葡萄球菌折点,质控菌为金黄色葡萄球菌ATCC 25923。

## 2 结果

**2.1 分离菌涂片镜检和培养结果** 脑脊液和阳性血培养液涂片革兰染色镜检可见革兰阳性杆菌,芽孢形成(不突出菌体),菌体两端平整,单个或呈短链排列,有白细胞内吞噬现象;脑脊液、阳性血培养液和导管尖端经24 h培养后,血平板上均生长为光滑有光泽、灰色不透明、β溶血性菌落,革兰染色镜检为粗细均匀的革兰阳性芽孢杆菌(芽孢位于菌体中间),两端平齐,呈链状排列。蜡样芽孢杆菌培养和革兰染色镜检结果见图1。



注:A为脑脊液直接涂片革兰染色;B为血培养阳性涂片革兰染色;C为5%羊血平板24 h培养菌落特点;D为纯培养菌落革兰染色镜检特点。

图1 蜡样芽孢杆菌革兰染色镜检(10×100)G+杆菌

**2.2 分离菌鉴定和药敏结果** 经质谱(分值2.237)和16SrRNA分子鉴定(序列同源为99.5%),最终将所有分离菌确定为蜡样芽孢杆菌,测序结果见图2,质谱鉴定见图3。药敏结果显示青霉素(6 mm,R)、克林霉素(19 mm,D)、复方新诺明(12 mm,R)、头孢曲松(6 mm,R)、头孢西丁(6 mm,R)、苯唑西林(6 mm,R)、氨苄西林舒巴坦(6 mm,R)、红霉素(20 mm,I)、庆大霉素(22 mm,S)、左氧氟沙星(27 mm,S)、利奈唑啉(29 mm,S)和万古霉素(18 mm,S)。其中,R为耐药,I为中介,S为敏感。

\* 基金项目:首都临床特色应用研究重点专项(Z141107002514012)。

△ 通讯作者,E-mail:13683581168@126.com。



图2 16SrRNA 鉴定蜡样芽孢杆菌部分测序结果

**2.3 脑脊液常规、生化、微生物监测及血常规结果** 患者入院后共进行6次脑脊液检测,见表1。脑脊液细胞总数正常为小于 $10 \times 10^6/L$ ,蛋白正常范围为 $15 \sim 45 \text{ mg/dL}$ ,葡萄糖正常范

围为 $45 \sim 80 \text{ mg/dL}$ ,氯化物正常范围为 $123 \sim 130 \text{ mmol/L}$ ;血常规白细胞计数正常范围 $(4 \sim 10) \times 10^9/L$ ,中性粒细胞正常范围 $50\% \sim 75\%$ 。

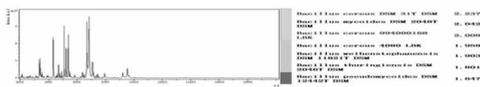


图3 质谱鉴定结果图

表1 脑脊液常规、生化、微生物监测及血常规结果

日期	脑脊液常规			脑脊液生化			脑脊液微生物		血常规	
	颜色、透明度	细胞总数 ( $\times 10^6/L$ )	白细胞数 ( $\times 10^6/L$ )	蛋白 (mg/dL)	葡萄糖 (mg/dL)	氯化物 (mmol/L)	涂片找细菌	培养结果	白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞 (%)
10月13日	淡黄色、浑浊	7 502	6 502 (多核97%)	432	14.40	110	G+杆菌	蜡样芽孢杆菌	23.14	90.0
10月14日	红色、浑浊有凝块	50 931	10 631 (多核94%)	480	27.36	108	G+杆菌	蜡样芽孢杆菌	10.55	82.1
10月20日	无色、透明	8	8	93	25.92	121	阴性	未生长	9.83	75.8
10月23日	无色、透明	6	6	71	22.14	119	阴性	未生长	8.32	74.0
10月26日	无色、清亮	5	5	51	34.74	119	阴性	未生长	7.29	75.0
10月29日	无色、透明	4	1	45	41.04	120	阴性	未生长	6.9	72.0

### 3 讨论

蜡样芽孢杆菌因常被认为是污染菌,由其引起的侵袭性感染报道相对较少<sup>[1]</sup>,近年来,有关蜡样芽孢杆菌引起非消化道感染病例的报道逐渐增多,可引起各种临床感染,如眼部感染(眼内炎)<sup>[1,8-9]</sup>、肺部感染(肺炎)<sup>[1,6]</sup>、菌血症(导管相关性血流感染)<sup>[5,6,10-12]</sup>、气性坏疽样感染<sup>[6]</sup>、皮肤软组织感染(蜂窝织炎)<sup>[6]</sup>、心内膜炎、骨关节感染(骨髓炎)、尿路感染(肾盂肾炎)和中枢神经系统感染(脑膜炎和脑脓肿)等<sup>[1,6,13]</sup>,尤其免疫抑制(恶性肿瘤或血液病)<sup>[6,11-13]</sup>、静脉注射毒品、新生儿<sup>[10]</sup>、术后伤口感染和有血管内导管插入或留置尿管<sup>[14]</sup>者更易发生该菌感染。

本例患者在接受鞘内吗啡泵植入术后1个月出现中枢神经系统感染症状,经腰穿进行脑脊液涂片发现可疑细菌并经培养、血培养瓶培养及导管尖端培养证实为同种细菌,经质谱和16SrRNA分子鉴定为蜡样芽孢杆菌,所有菌药敏谱相同,加上患者长期免疫抑制体质的危险因素,说明鞘内滞留导管为引起本次化脓性脑膜炎的来源,而早期拔除任何引起感染的导管或脑室分流术对临床诊疗和避免持续感染或复发很关键<sup>[5]</sup>,本例经微生物室及时报告危急值给临床后,及时拔除导管并行腰大池引流及万古霉素、左氧氟沙星等药物治疗后感染被控制。与文献<sup>[13-14]</sup>报道中枢神经系统感染的途径与感染菌血症的导管和用于鞘内化疗的导管产生生物膜黏附而感染相一致。

针对革兰阳性杆菌的纸片琼脂扩散试验 CLSI 没有标准化药敏和解释,但指南指出可参考革兰阳性球菌(如葡萄球菌和链球菌)折点进行判读。文献报道蜡样芽孢杆菌产 $\beta$ -内酰胺酶对青霉素、苯唑西林和头孢菌素类耐药,并发现对碳青霉烯类、克林霉素和红霉素耐药菌株,对万古霉素、庆大霉素、左氧氟沙星、利奈唑胺和环丙沙星均敏感<sup>[15]</sup>。可见,临床在得到涂片阳性结果而等待药敏时,准确的经验性药物的选择很重要。文献认为疑似蜡样芽孢杆菌感染时首选药物为万古霉素,系统性感染推荐万古霉素和氨基糖苷类或喹诺酮类联合治疗<sup>[6-7]</sup>。本例分离菌药敏结果与上述报道一致,应用万古霉素联合美罗培南经验性治疗后按药敏调整为左氧氟沙星取得了很好的疗效。

通过文献复习和本例报道,蜡样芽孢杆菌为正在增加的潜在感染人类的病原体<sup>[6]</sup>,临床医生和微生物学家应重视临床无

菌部位标本中分离的有意义的阳性杆菌,而不应一概认为是污染而放弃,尤其在以下情况下应及时与临床医生沟通交流,选用合适抗菌药物的同时拔除留置导管以改善病人预后,降低病死率:(1)接受白血病化疗病人血培养检测出蜡样芽孢杆菌,不应视为污染;(2)临床从无菌部位(关节液、脑脊液、骨髓等)分离到蜡样芽孢杆菌,尤其免疫抑制患者,不应视为污染;(3)眼内容物、玻璃体等培养出蜡样芽孢杆菌,不应视为污染;(4)如果一组血培养中有1瓶培养阳性,需进一步的检测,不应视为污染而放弃临床追踪;(5)静脉导管应考虑作为一个潜在的感染源,必要时拔出导管进行诊断性培养;(6)应注意发生蜡样芽孢杆菌感染的危险因素,如嗜中性粒细胞减少症、接受免疫抑制剂治疗或使用三代头孢菌素、近期接受腰穿或鞘内治疗、长期留置导管等;(7)如怀疑该菌败血症,经验性治疗应选择万古霉素或喹诺酮类抗菌药物,而不是碳青霉烯、广谱头孢菌素或克林霉素等;(8)如出现中枢神经系统症状,除合适抗菌药物外,还应考虑立即拔除任何感染导管和预防性使用喹诺酮类药物以降低病死率和复发率。

### 参考文献

[1] Veysseyre F, Fourcade C, Lavigne JP, et al. Bacillus cereus infection: 57 case patients and a literature review[J]. Med Mal Infect, 2015, 45(11/12): 436-440.

[2] Kalpoe JS, Hogenbirk K, van Maarseveen NM, et al. Dissemination of Bacillus cereus in a paediatric intensive care unit traced to insufficient disinfection of reusable ventilator air-flow sensors[J]. J Hosp Infect, 2008, 68(4): 341-347.

[3] Sasahara T, Hayashi S, Morisawa Y, et al. Bacillus cereus bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(2): 219-226.

[4] Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, et al. Bacillus cereus nosocomial infection from reused towel in Japan[J]. J Hosp Infect, 2008, 69(4): 361-367.

[5] Kassar R, Hachem R, Jiang Y, et al. Management of Bacillus bacteremia; the need for catheter removal[J]. Medicine

(Baltimore), 2009, 88(5): 279-283.

[6] Bottone EJ. Bacillus cereus, a volatile human pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 382-398.

[7] 刘泽春. 一起蜡样芽孢杆菌污染多种多餐食物引起中毒的调查分析[J]. 河南预防医学杂志, 2015, 26(1): 89-91.

[8] 毛丽萍, 王大选, 黄晓彤, 等. 致眼部感染病原菌及其耐药性分析[J]. 中国微生物学杂志, 2015, 27(3): 341-344.

[9] Lam KC. Endophthalmitis caused by Bacillus cereus: a devastating ophthalmological emergency[J]. Hong Kong Med J, 2015, 21(5): 475.

[10] Hilliard NJ, Schelonka RL, Waites KB. Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3441-3444.

[11] Daichi I, Yuya N, Minako M, et al. Fulminant sepsis caused by Bacillus cereus in patients with hematologic malignancies: analysis of its prognosis and risk factors

[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(5): 860-869.

[12] Uchino Y1, Iriyama N, Matsumoto K, et al. A case series of Bacillus cereus septicemia in patients with hematological disease[J]. Intern Med, 2012, 51(19): 2733-2738.

[13] Gaur AH, Patrick CC, McCullers JA, et al. Bacillus cereus bacteremia and meningitis in immunocompromised children[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(10): 1456-1462.

[14] Kuroki R, Kawakami K, Qin L, et al. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis[J]. Intern Med, 2009, 48(10): 791-796.

[15] Kiyomizu K1, Yagi T, Yoshida H, et al. Fulminant septicemia of Bacillus cereus resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia[J]. J Infect Chemother, 2008, 14(5): 361-367.

(收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-05-31)

• 案例分析 •

## 急性髓性白血病的鉴别诊断

王丽斌<sup>1</sup>, 于远军<sup>1</sup>, 姜丽杰<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup>

(1. 辽宁省大连市第三人民医院检验科 116033; 2. 上海交通大学附属瑞金医院, 上海 200025)

关键词: 急性白血病; 细胞形态; 融合基因; 鉴别诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.070 文献标志码: C 文章编号: 1672-9455(2016)14-2071-02

急性白血病严重威胁着现代人们的健康, 随着全球环境的恶化, 患病率有着逐年上升的趋势。细胞形态学镜检是急性白血病诊断的基础和核心, 但凭形态分型有一定困难, 诊断符合率只有 60%~70%。随着生物分子学的发展, 不少融合基因在病程中有稳定且有独特的形态学和临床特点, 在急性白血病分型及分析预后起了重要作用。本文将对三种不同类型的急性髓性白血病进行鉴别分析。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年至 2013 年本院及上海交通大学附属瑞金医院共 19 例初发的急性髓系白血病住院患者, 其中男 10 例, 女 9 例, 年龄 18~69 岁。

1.2 仪器 日本希森美康 XE2100 血球仪, 美国 BD FACS-Calibur 流式分析仪, OLYMPUS CX21 光学显微镜。

### 1.3 方法

1.3.1 染色 对外周血人工分类 100 个有核细胞, 骨髓分类 200 个有核细胞, 采用常规瑞氏染色和组化染色。同时采用细胞化学染色, 包括过氧化物(POX)酶染色, 糖原(PAS)染色, 氯乙酸 AS-D 萘酚酯酶(NAS-DCE)染色, 乙酸 AS-D 萘酚酯酶(NAS-DAE)染色加氯化钠(NAF)抑制试验。

1.3.2 免疫学检测 采用流式细胞分析仪检测肝素抗凝骨髓活细胞。

1.3.3 染色体常规检测 采集骨髓后在 24 h 内培养收集细胞, 采用 R 显带方法, 核型分析根据国际命名法(ISCN)。

1.3.4 分子生物学检测 采用巢式逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法。

### 2 结果

2.1 外周血象结果 外周血象检测结果见表 1。

表 1 M2b、M3 及 M4Eo 患者的外周血象结果(n)

疾病分类	血红蛋白(g/L)			白细胞( $\times 10^9/L$ )			血小板( $\times 10^9/L$ )		原始细胞	
	$\geq 31\sim 60$	$\geq 61\sim 90$	$\geq 91\sim 110$	$\leq 4$	$\geq 4.1\sim 10$	$\geq 10$	$< 100$	$\geq 100$	$\leq 10$	$> 10$
M2b(n=3)	0	3	0	0	0	0	2	1	0	3
M3(n=10)	2	5	3	5	1	4	10	0	0	10
M4EO(n=6)	0	4	2	0	0	6	6	0	0	6

表 2 M2b、M3 及 M4Eo 病人的骨髓象及组化染色检查结果(n)

疾病分类	增生程度		异常细胞			POX 阳性	PAS 阳性	CE 阳性	AE 阳性	NAF 抑制率(%)	
	极度活跃	明显活跃	异常早幼粒	异常中幼粒	异常嗜酸细胞					$\leq 30$	$\geq 31\sim 70$
M2b(n=3)	0	3	0	3	0	2	0	0	3	3	0
M3(n=10)	4	6	10	0	0	10	10	10	10	9	1
M4EO(n=6)	2	4	5	0	1	6	1	0	6	1	5