

一例医务人员羊布鲁菌血流感染的实验室诊断及思考

向 韬, 陈莎娜*

(重钢总医院检验科, 重庆 400081)

摘要: 目的 研究实验室布鲁菌检测的方法并进行临床效果评价。**方法** 以我院2019年3月医务人员确诊为羊布鲁菌感染的临床病例为研究对象, 通过分析探讨血清凝集试验、常规血培养及细菌鉴定、质谱鉴定方法在诊断布鲁菌的优缺点, 为基层医院实验室布鲁菌的检测工作提供一些参考。**结果** 该医务人员的血清布病虎红平板凝集抗原实验阳性; 血培养美国BD Phoenix™全细菌鉴定/药敏系统仪器提示需氧瓶报阳, 但不能鉴定出布鲁菌的种属; 质谱仪鉴定为羊布鲁氏菌。**结论** 介于以上方法应用各有优缺点, 基层医院实验室应根据实际情况选择适合的方法检测布鲁菌。

关键词: 布鲁菌检测; 血清凝集试验; 血培养; 细菌鉴定; 质谱鉴定

Laboratory diagnosis and reflection on a case of Brucella lambia bloodstream infection among medical staff

XIANG Tao, CHEN Sha-Na*

(Department of Laboratory Medicine, Chonggang General Hospital, Chongqing 400081, China)

ABSTRACT: Objective To study the method of laboratory Brucella detection and evaluate its clinical efficacy. **Methods** The clinical case of Brucella infection in sheep diagnosed by medical staff in our hospital in March 2019 was taken as the research object. The advantages and disadvantages of serum agglutination test, routine blood culture and bacterial identification, and mass spectrometry identification methods in diagnosing Brucella were analyzed and discussed, providing some reference for the detection of Brucella in grassroots hospital laboratories. **Results** The medical staff's serum brucellosis tiger red plate agglutination antigen test was positive. The blood culture BD Phoenix™ whole bacterial identification/drug sensitivity system instrument in the United States indicates that the aerobic bottle reports positive, but cannot identify the species of Brucella. The mass spectrometer identified it as Brucella lambia. **Conclusion** The above methods have their own advantages and disadvantages in application, grassroots hospital laboratories should choose suitable methods for detecting Brucella based on actual conditions.

KEY WORDS: Brucella detection; serum agglutination test; blood culture; bacterial identification; mass spectrometry identification

0 引言

我国布鲁菌病的发病率逐年上升, 除澳门和台湾疫情未知外, 所有的省级单位均已经报告发现布鲁菌病病例^[1]。目前, 重庆多家医院均有收治布鲁氏菌病患者史, 但鲜有关于医务人员在院内发生布鲁氏菌感染的报道。本例感染布鲁菌的微生物室医务人员有布鲁氏菌病患者标本接种史, 属于医院感染。布鲁菌病检测方法有一般实验室检测、细菌培养、血清学检测、分子生物学检测等。基层医院关于布鲁菌的检测手段相对局限, 患者或医务人员

职业暴露感染布鲁菌病后, 存在不能及时确诊的风险。本文回顾此次院内布鲁菌感染的实验室诊断过程, 并提出相应思考。

1 资料与方法

1.1 病史

患者为检验科微生物检验人员, 女, 32岁, 2019年1月13日, 接种报阳血培养瓶发生针刺伤, 当场严格执行“一挤、二洗、三消毒”, 追踪污染源的流行病学资料, 暴露源患者HCV抗体、HbsAg、HIV抗体、梅毒抗体均阴性, 未做预防性用药治疗。

* 通信作者: 陈莎娜, 副主任检验师, 研究方向为微生物检验及分子检测。E-mail: 654980853@qq.com

* Corresponding author: CHEN Sha-Na, Deputy Chief Inspector, Department of Laboratory Medicine, Chonggang General Hospital, Chongqing 400081, China. E-mail: 654980853@qq.com

职业暴露2周后(1月28日),患者针刺伤部位出现脓肿,遂进一步追踪暴露源,系转入外院后确诊为布鲁菌感染,但该检验人员咨询临床医师后仍未服用相关药物行预防性治疗。职业暴露近2个月(3月8日),该检验人员出现不明原因发热、乏力、退热后大汗,反复发热持续一周,稍感心慌,无咳嗽、咳痰,无关节酸痛。初步完善相关检查后我院门诊医师考虑“流行性

感冒”可能,予以奥司他韦抗病毒、头孢类抗生素抗感染治疗无效,遂转入上级医院进一步治疗。确诊马耳他布鲁菌感染后,检验人员自行口服利福平400 mg/d联合多西环素200 mg/d,用药三天后体温即恢复正常,持续用药4个月,停药后每个月复查血培养、血常规、肝功、心肌酶谱均正常。该医务人员职业暴露病情变化具体过程见表1。

表1 医务人员职业暴露病情变化过程表

Table 1 The change process table of medical staff occupational exposure condition

日期	暴露部位情况及症状	治疗	实验室检查
1月13日	左手无名指第一指节针刺伤无血常规、生化检测		
1月28日	针刺伤部位有脓肿,已明确暴露源为布鲁菌	无	无
3月8日	无明显诱因发热,稍感心慌	无	无
3月9日—11日	退热后,大汗淋漓,仍然发热,心慌	口服退烧药蒲地蓝消炎片	无
3月12日	反复发热,头痛,心慌	口服三代头孢炎琥宁输液奥司他韦	血常规、生化检测,本院抽取血培养
3月16日—17日	退热明显,头痛症状减轻	口服多西四环素利福平	新桥医院质谱仪鉴定结果:羊布鲁菌
3月22日	未再发热,无头痛,无心慌	口服多西四环素利福平	血标本送重庆市疾控中心血清学检测,检测结果为布鲁菌抗体1:800阳性
至今	未再复发	口服多西四环素、利福平4个月后停药	血常规、生化检测(随访监测)

1.2 检测方法

1.2.1 血常规及生化检测

取患者静脉血3 mL于EDTA抗凝管,颠倒混匀1分钟后用迈瑞7500进行血液常规及CRP分析。取患者静脉血5 mL于促凝管并静置10分钟,4000 g离心10分钟后用Cobase 602全自动生化分析仪检测PCT、白介素6、肝功及心肌酶谱。

1.2.2 常规血培养及细菌鉴定

患者2019年3月12日在应用退烧药物前,静脉采集血培养4瓶(双侧双瓶),每瓶采集静脉血10 mL,并在采集后2小时内送至实验室采用美国BD公司BACTEC-9240血培养仪培养,68小时后两瓶需氧瓶均报阳,厌氧瓶未报阳。按本实验室项目处理的标准作业指导书要求,接种报阳培养瓶的血液到分离培养基平板并进行培养。培养分纯后,使用BD配套的盐水、棉签、比浊仪配置质量要求范围内的浊度菌液,然后放入鉴定卡上机检测。

1.2.3 虎红平板凝集实验(RBPT)

在洁净玻片上加30 μ L待检血清,然后加入虎红凝集抗原30 μ L,用木签或者枪头充分混匀,在5分钟内观察结果。每批次实验同时用阴性和阳性血清作对照。出现肉眼可见的凝集反应为阳性,而液体均匀浑浊、未见凝集反应为阴性。

1.2.4 试管凝集试验(SAT)

主要设备及试剂包括试管凝集抗原、被检测血清、0.5%的石碳酸生理盐水、细管、试管、孵箱等。将待测血清稀释为1:12.5、1:25、1:50、1:100、1:200及1:400等。用0.5%石碳酸生理盐水处理抗原按照1:10的比例进行稀释,稀释后将其加入被稀释的血清试管中,用于和不加抗原的血清管进行对照。试管凝集试验主要根据各管中上液体的清亮程度判定结果。待测血清效价在1:100以上者阳性;1:50为可疑,以下为阴性。

1.2.5 质谱仪器鉴定

挑取单个菌落于75%的乙醇溶液(100 μ L左右)中混匀,14000 r/min离心2 min后弃上清,在菌落沉淀中加入70%甲酸溶液和乙腈各10 μ L,混匀裂解细菌,各取1 μ L裂解液点样至MSP 96靶板的8个靶位上,室温下自然干燥后,每个靶

位加入1 μ L α -氨基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质,自然干燥后放入MicroflexTMTL型MALDI-TOF MS仪进行检测。

1.3 其他辅助检查

检查结果显示胸片无明显异常,腹部彩超显示脾稍大。

2 结果与分析

2.1 血常规及生化指标的结果分析

血常规结果显示白细胞 $4.39 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比35.0%,淋巴细胞百分比57.9%,CRP 17 mg/L。血象结果未见明显异常,CRP提示有炎症。

生化结果显示PCT 0.16 ng/mL,白介素6为14.35 pg/mL,丙氨酸氨基转移酶42 U/L,天门冬氨酸氨基转移酶44 U/L,乳酸脱氢酶431 U/L, α -羟丁酸脱氢酶300 U/L。PCT和白介素6提示感染,心肌酶谱提示有心肌炎。

2.2 布鲁菌不同检测方法的结果分析

用无菌注射器抽取阳性血培养瓶中液体革兰氏染色后镜检,镜下可见短小球杆菌,阴阳着色较弱,菌体排列如沙样团状(见图1)。将阳性瓶中液体接种于哥伦比亚血平板,置于35 $^{\circ}$ C,5% CO₂孵箱中,24 h平板未长菌落,48 h后均可见白色细小菌落,表面光滑稍隆起(见图2)。该医务人员血清虎红平板凝集试验结果为阳性;血清学检测试管凝集试验检测结果为布鲁菌抗体1:800阳性。美国BD PhoenixTM全细菌鉴定/药敏系统仪器无法鉴定布鲁菌,阳性菌落进行质谱仪器鉴定,结果为羊布鲁氏菌。

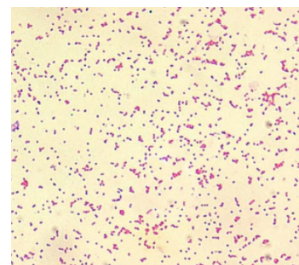


图1 显微镜下的布鲁氏菌(革兰染色 X1000)

Fig.1 Brucella under microscope (Gram staining X1000)



图2 血平板上的布鲁氏菌落
Fig.2 Brucella colony on blood plate

3 讨论与结论

我国布鲁菌病发病区主要在内蒙古、东北、华北、西北等以畜牧业、肉类、奶制品加工为主的地区,其他多为散发区^[2]。本例报道中的感染者为医务人员,主要从事检验科微生物工作,没有与病畜直接接触或食用病畜奶制品或者未熟肉制品的经历。追踪暴露源系我院收治的一例以发热、畏寒、乏力、纳差为主要症状的患者。针对此例医务人员羊布鲁菌血流感染进行血清凝集试验、常规血培养、细菌鉴定及质谱鉴定等多种方法检测,对布鲁菌的检测进行深入探讨。

关于布病的检测方法主要包括病原学检测、分子生物学检测及血清学检测。本次布病的检测包括血清学检测和病原学检测。外周血中培养出布鲁菌仍然是目前诊断的金标准^[3]。但是血液培养物中分离出苛求病原体的比率较低,该病原菌分离鉴定比较困难。如本案例检验人员及暴露源病人血培养需氧瓶均报阳,接种并分离培养后采用的美国 BD PhoenixTM 全细菌鉴定/药敏系统仪器并不能够鉴定出布鲁菌的种属,却鉴定为伯克霍尔德菌属。在临床上容易造成布鲁菌病的漏检,一定程度上限制其在布鲁菌检测中的应用。在实际检验操作中,血培养物中分离出病原体的比率较低,且对病原菌进行准确分离鉴定比较困难。因此,需要结合其他检测手段进一步确认。

血清凝集试验作为布鲁菌检测的常用方法之一,具有操作简便、快速的特点。本例患者进一步进行血清凝集试验,其血清虎红平板凝集试验和试管凝集试验均呈阳性,为初步判断布鲁菌感染提供了重要依据。血清学检测敏感性和特异性相对较高,但仍存在一定的假阳性和假阴性率,本例患者进一步进行了质谱鉴定。质谱鉴定可以弥补传统鉴定方法不能鉴定疑难病原菌的缺陷,鉴定菌种覆盖面更广,较常规的微生物培养鉴定方法具有检测时间更快、准确率更高的特点,但是涉及成本等原因该技术在基层医院的普及率并不高。本例采用质谱仪器对阳性菌落进行鉴定,成功鉴定出羊布鲁氏菌。

布病的血清学检测具有操作简便优势,但是目前还没有一种完全具备敏感性高、特异性强、检测速度快等检测方法,常需两种或两种以上方法配合使用。此外,布鲁菌患者血常规及生化指标均有不同程度的改变,但缺乏特异性^[4-5]。本例患者综合采用了常规血培养、细菌鉴定、血清凝集试验及质谱鉴定等多种检测方法。常规血培养及细菌鉴定提示感染,经血清凝集试验初步判断布鲁菌感染,进一步质谱鉴定明确布鲁菌感染。

布鲁氏菌病是全世界最常见的实验室获得性细菌感染^[6]。国内已经报道过多起实验室布鲁菌感染的案例^[7-9]。国外同样报

道过实验室人员由于检测布鲁氏菌患者的标本过程中产生的气溶胶被感染患病^[10]。本案例提示在微生物检验操作过程中,使用完后的血培养接种一次性注射器应该直接置于锐器桶,避免重复使用一次性的针头回套针帽。此外,微生物人员对于血培养报阳时间较长,转种后菌落生长缓慢的沙样小菌落,应考虑到布鲁菌的可能性,应反复追问临床病史和严格规范操作。魏赐开^[11]等人报道在布鲁氏菌羊群疫情处置的采样过程中,三名工作人员不慎被刚采样使用过的采样针刺伤了手指,被刺后,立即采取了由近心端向远心端挤压创口后用碘酒消毒创口的措施,并在处理创口的基础上,服用盐酸多西环素片、利福平胶囊和护肝片,连续服用两周,结果未被感染。以上预防性治疗等防范措施值得广大实验室医务人员的参考。

医院检验科实验室应具备培养、鉴定布鲁菌的能力。除了现有的检测方法外,应该探索更多的新技术检测方法,比如荧光微球法、半抗原鉴别诊断方法等。基层医院应该根据自身设备条件、微生物人员操作技能水准择优选择合适的方法学满足临床需要。此外,由于布鲁菌的侵袭力较强,可通过完整的皮肤、呼吸道侵入人体,实验室工作人员应做好生物危害防护工作,防止感染。

参考文献

- [1] 张海霞,杜刚,许海峰.布鲁菌病确诊病例1例报道[J].检验医学,2019,34(10):962-964.
- [2] 马逸珉,阮斐怡,蒋晓飞.马耳他布鲁菌病一例报道[J].检验医学,2010,25(05):364-367.
- [3] 董巧荣.4例菌血症布鲁氏菌血培养特性分析[J].甘肃医药,2017,36(05):375-376.
- [4] 薛继华,程君,马雪娇.25例布鲁菌病的临床特征分析[J].中国临床药理学志,2020,36(10):1173-1175.
- [5] 陈晶晶,董明环.155例布鲁菌病的临床特征及实验室检查分析[J].系统医学,2018,3(21):26-28.
- [6] YAGUPSKY P, BARON EJ. Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(08):1180-1185.
- [7] 徐卫民,王衡,施世锋,等.浙江1例实验室感染布鲁氏菌病例及其警示[J].中国地方病防治杂志,2010,25(01):58.
- [8] 余淑霞,王志翔,许婷,等.1例微生物室实验人员感染布鲁氏菌的调查分析[J].宁夏医科大学学报,2017,39(01):107-109.
- [9] 何海洪,陈艳清,张恒恒,等.布鲁菌培养阳性一例并致实验室人员感染一例[J].中国传染病杂志,2014,32(06):352.
- [10] LOWE CF, SHOWLER AJ, PERERA S, et al. Hospital-Associated Transmission of *Brucella melitensis* outside the Laboratory [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(01):150-152.
- [11] 魏赐开,刘松,刘兵.一起山羊布鲁菌病疫情处置及职业暴露的处理[J].中国兽医杂志,2017,53(01):119-120.

作者简介

向韬, 主管检验师, 研究方向为微生物检验及生物化学检测。

陈莎娜, 副主任检验师, 研究方向为微生物检验及分子检测。